Report on Status and Trends in
In Vitro Toxicology and Methodology
Modifications for Reducing Animal Use

Health and Welfare Canada
Santé et Bien-être social Canada

Canada

91-05035/

REPORT ON STATUS AND TRENDS

in
IN VITRO TOXICOLOGY

and
METHODOLOGY MODIFICATIONS

for
REDUCING ANIMAL USE

Prepared by:
J.P.W. Gilman, D.V.M.
Professor Emeritus
Biomedical Sciences
University of Guelph

Executive Director
The Joseph F. Morgan Research Foundation
Ottawa, Ontario

Health and Welfare Canada
February 1991

DD-90-11

This report was prepared under contract #1985 for the Drug Toxicology Division, Bureau of Drug Research, Health Protection Branch, Health and Welfare Canada. May 1989. Revised and updated January 1990.

The views expressed are solely those of the author and not necessarily those of the Department.

Report on Status and Trends in In Vitro Toxicology and Methodology Modifications for Reducing Animal Use

©Minister of Supply and Services Canada
1990
Catalogue No. H42-2/42-1990
ISBN 0-662-57744-2

FOREWORD

The Drug Toxicology Division of the Bureau of Drug Research, Health Protection Branch (HPB), Health and Welfare Canada, commissioned this report in December, 1988, for submission for internal review purposes by mid-May, 1989. Revisions based on the internal reviews and an updating were then undertaken by its original author.

The report is not intended and does not attempt to deal in detail with, or pass judgement on, the relative merits of specific test protocols or testing strategies. Its intent is, however, to deal in some depth and breadth with the state of the art of in vitro toxicology and other trends in alternative toxicological testing that may lead to a reduction in the use of animals for these purposes. It attempts to do this on an international as well as a national basis.

The emphasis throughout the report is on those aspects of alternative testing (as defined) that were considered to be of particular relevance in the toxicology of pharmaceuticals and biologicals. However, the toxicological testing of consumer chemicals, agricultural chemicals, and foods is also considered, albeit in less detail. This has been done particularly where innovative procedures that may be applicable to drugs have undergone development, trial use, validation, and/or acceptance for other purposes. Toxicological testing and risk assessment criteria are understandably more stringent for drugs and biologicals than for consumer chemicals and cosmetics. The principles involved are the same, however, and there is an increasing urgency to the extension of toxicological testing in the protection of the environment.

In reviewing the rather limited toxicology testing research and development undertaken in Canada, the focus has been on work within HPB, particularly within the Drugs Directorate. However, it is also true that with the exceptions noted in the report, very little toxicology testing R&D appears to be under way in Canada at this time. This is especially true of in vitro toxicology and method modification research and validation.

One of the objectives of this report is to draw attention to the relatively poor record of Canadian government agencies and industry in encouraging and supporting this increasingly important area of technological development. This deficiency is particularly notable in comparisons with Europe and the US.

Acknowledgement: The author gratefully acknowledges the unstinting help received from Ms. Frances Rodenburg in editing this manuscript and the generosity of the Canadian Federation of Humane Societies in providing him with computer facilities and other assistance.

TABLE OF CONTENTS

FOREWORD		i
TABLE OF CONTENTS		ii
DEFINITIONS		v
EXECUTIVE SUMMARY		1
1.0	INTRODUCTION	5
2.0	TOXICOLOGICAL TESTING	6
	2.1 Basis and Applications	6
	2.2 The Chemicals Log Jam	7
	2.3 Adequacy of Toxicological Information Available	7
3.0	ANIMAL TESTING: COMMENTS AND PROBLEMS	10
	3.1 Costs of Testing (Money and Time)	10
	3.2 Weighting Information of a Lesser Quality	11
	3.3 Ethical Considerations	11
	3.4 Reliability of the Rodent Bioassay	12
4.0	ALTERNATIVE TESTING: COMMENTS AND PROBLEMS	14
	4.1 Animal Welfare Influence	14
	4.2 Funding	14
	4.3 False Positives in Short-Term Assays	15
	4.4 Genotoxicity Testing	16
	4.5 Validation	17
	4.6 Regulatory Acceptance	19
5.0	ACUTE TOXICITY	21
	5.1 Median Lethal Dose Test (LD50)	21
	5.2 Classification of Toxic Substances	23
	5.3 Current Regulatory Trends	23
	5.3.1 OECD Guideline Update (1987) Proposals (1989-90)	25
	5.3.2 European Economic Community	25
	5.3.3 European Industry's Position	26
	5.3.4 Japanese Initiatives	28
	5.3.5 Progress in the US (EPA and FDA)	28
6.0	SKIN AND EYE IRRITATION	30
	6.1 The Draize Test	30
	6.2 An Industry Perspective - Europe	30
	6.3 Recent Advances - US	32
	6.3.1 Centres for the Study of Alternatives	32
	6.3.2 The Role of Industry Associations	33

7.0 ACUTE TOXICITY: CANADIAN PERSPECTIVES 36
7.1 Health Protection Branch 36
7.2 Testing Requirements and Guidelines (LD50) 36
7.2.1 Drugs 36
7.2.2 Food 37
7.2.3 Agricultural Chemicals; Environmental Protection 38
7.3 Eye and Skin Irritancy 39
7.3.1 Regulations 39
7.3.2 Industry's Responsibility 40
7.3.3 Cruelty-Free Cosmetics? 40
7.3.4 Research 41

8.0 REPEAT DOSE TESTING 42
8.1 Sub-Acute Tests 42
8.2 Sub-Chronic Studies 43
8.3 Reproductive Toxicology Testing 44
8.4 Canadian Regulatory Requirements 44

9.0 CHRONIC TOXICITY AND CARCINOGENICITY 45
9.1 Long Term Tests 45
9.1.1 Risk Assessment 45
9.1.2 Rodent Bioassays 45
9.2 Short Term Tests 47
9.2.1 Genotoxicity 47
9.2.2 Structure Activity Relationships 48
9.2.3 Computerized Data Banks 49
9.2.4 Non-Genotoxic Carcinogens 49
9.3 Some Policy Positions and Views 50
9.3.1 Japan 50
9.3.2 US: FDA and EPA 50
9.3.3 Some NIEHS-NTP Views and Comments 51

10.0 EUROPEAN DIRECTIONS 53
10.1 In Vitro Toxicology Research 53
10.1.1 Concepts 53
10.1.2 Recent Progress 53
10.2 European Research Institutes 54
10.2.1 France 54
10.2.2 Switzerland 56
10.2.3 West Germany 58
10.2.4 Regulatory Collaboration 59
10.3 Other European Initiatives 60
10.3.1 Industrial Association Activities 60
10.3.2 Data Banks 61
10.3.3 Evaluation Studies and Research Support 62

11.0 ACTIVITIES IN CANADA 63
11.1 Health Protection Branch Laboratories 63
11.1.1 The Bureau of Biologics (BoB) 63
11.1.2 The Bureau of Drug Research 64
11.1.3 Environmental Health Directorate 66
11.1.4 Food Directorate 67
11.2 Health of Animals Laboratories 67
11.3 University Toxicology Centres 68
11.4 Other University Programs 69
11.5 Research Grants 70
11.6 A Model for Co-operation 71
11.7 Harmonization of Regulations and Guidelines 71

REFERENCES 73

APPENDIX 1 80
International Collaborative Study
Acute Oral Toxicity Testing of Substances and Preparations

APPENDIX 2 90
Society of Toxicology of Canada Position Paper on the LD50

APPENDIX 3 94
Conflicting Indications in Canada

APPENDIX 4 95
Alternative In Vitro Methods, ECETOC Monograph #11

APPENDIX 5 105
AUCC Statement on the Use of Animals in Research and Testing

APPENDIX 6 106
Proposed University of Saskatchewan Position on LD50
and Draize Eye Irritancy Testing

LIST OF TABLES AND FIGURES

TABLE I - Comparison of In Vivo and In Vitro Test Methods 1
FIGURE 1 - Adequacy of Available Toxicity Data 8
TABLE II - Estimated Percentages of Substances 9
TABLE III - Shortcomings of the LD50 Test 22
TABLE IV - Criteria for Classification of Toxic Chemicals 24
TABLE V - Commission Statement on LD50 and Classification 27
FIGURE 2 - Stepwise Strategy - Ocular Irritation 31
TABLE VI - Low Volume Test 34
TABLE VII - Summary Joint Government-Industry Workshop 35

DEFINITIONS

The following definitions will be used for the purposes of this report:

ALTERNATIVES: Any subject, protocol, or technology that replaces the use of laboratory animals altogether, reduces the numbers of animals used, or refines existing procedures or technologies so as to minimize the level of stress endured by the animal.

The above definition is the one used in the US Office of Technology Assessment Report on Alternatives to Animal Use in Research, Testing and Education (OTA, 1986). It makes use of the three R's cliché of replace, reduce, and refine.

ANIMAL: All animals exclusive of the unicellular protozoa and human primates. Animals in turn are subdivided for the purposes of this report into:

a) Invertebrate Animals: all non-vertebrate animal classes except protozoa.

b) Cold Blooded Animals: reptiles, amphibia and fish.

c) Warm Blooded Animals: all non-human mammals and birds, including their fetal forms, subsequent to the mid-point in gestational or incubational development.

These arbitrary divisions are introduced in consideration of the use currently being made of evolutionarily less advanced animals and of mammalian and avian embryonic forms as replacements for mammals in certain toxicological tests.

BIOAVAILABILITY: The degree to which a drug or other substance becomes available to the target tissue after administration.

BIOLOGICALS: Medicinal preparations made from living organisms and their products, including serums, vaccines, antigens, antitoxins, antibiotics, etc.

BIOTRANSFORMATION: The series of chemical alterations of a compound (drug) which occurs within the body, as by enzymatic activity.

CARCINOGENSIS: Referring to the production of cancer.

EXCIPIENT: Any more or less inert substance added to a prescription (formulation) to confer suitable form or consistency -- a vehicle.

GENETIC MUTATION: A permanent transmissible change to the genetic material. May be a single gene molecular alteration, exchange (transduction), loss (deletion), or addition (translocation) of genetic material.

HYPERPLASTIC: Of increasing size due to increased number of cells or excess formation of tissue.

KINETICS: Pertaining to force and/or motion.

MICRONUCLEUS: A small nucleus; a small portion of nuclear material located outside the membrane of the main nuclear body (macronucleus).

MICRO-ORGANISMS: Collectively, all the protozoa, algae, molds, yeasts, bacteria and viruses.

MICROSOME: A vesicular fragment of endoplasmic reticulum formed after disruption and centrifugation of a cell.

MUTAGENESIS: The induction of genetic mutation.

PARENTERAL: Route of administration by injection; not by the alimentary canal or external application.

PERFUSION: The introduction of fluids into tissues by their injection into blood vessels.

PHARMACODYNAMICS: Study of the biochemical and physiological effects of drugs and the mechanisms of their actions, including the correlation of actions and effect with their chemical structure.

PHARMACOKINETICS: The action of drugs on the body over a period of time, including the processes of absorption, distribution, localization in tissues, biotransformation, and excretion.

SOMATIC MUTATION: A permanent transmissible change to the genetic materials occurring in a somatic (body) cell as opposed to a germ cell and thus transmissible only to its daughter cells. The basis for a mosaic.

TOXICOLOGY: The sum of what is known regarding poisons, the scientific study of poisons, their actions, detection, and the treatment of the conditions produced by them.

IN VITRO TOXICOLOGY: The study of cultured cells in response to toxic agents. Tests are designed to identify xenobiotics inducing end-points known to be detrimental to human health from correlation with pathology and biochemical data.

GENETIC TOXICOLOGY (or environmental mutagenesis): The specialized sub-discipline of in vitro toxicology concerned with the identification of those substances that provoke genetic changes in micro-organisms, mammalian cells in culture, and either the somatic or germ cells of plants and animals.

Intense research activity in this discipline, particularly in environmental mutagenesis, since the mid-1970s has resulted in the development of a wide variety of short-term biological tests designed to detect a wide variety of genetic and cytological end-points.

XENOBIOTIC: A chemical foreign to the biologic system.

EXECUTIVE SUMMARY

Regulatory toxicologists in North America must presently contend with:

- an inventory of 70,000 "existing" chemicals;
- over 1,000 "new" chemical submissions annually (US-EPA);
- no toxicity information on 25% and 38% respectively of drugs and pesticides (75% of commercial chemicals);
- only minimal toxicity data on another 39% and 36% of drugs and pesticides;
- steadily increasing public and legislative expectations for protective monitoring of health and environmental risks;
- escalating, vociferous demands for reduced animal use; and
- industry pressure for new product clearance.

A review of these problems provides the proper perspective for consideration of trends in in vitro toxicology and the modification of traditional testing procedures.

The strengths and weaknesses of traditional (in vivo) and short term (mostly in vitro) systems of testing are dealt with in detail in Chapters 3 and 4 respectively. Their pros and cons are compared in Table I.

TABLE I

Comparison of In Vivo and In Vitro Test Methods

Item	In Vivo	In Vitro
Historical Data	extensive	very limited
Classification	international use	not used
As substrate for reaction	"whole animal" interaction	isolated cells, organs
Regulatory testing demands	cannot keep up escalating deficit	could keep pace reduce deficit
Costs: · acute tests · carcinogenicity	moderate $1 million each	low moderate
Public Perception	mostly negative	mostly positive
Predictive Ability	best available	under scrutiny

The predictive capabilities of rodent bioassays and genotoxicity tests are reviewed. Reservations have been expressed about the reliability of the former (p 12; 49), while recent evidence has suggested that mutagenesis tests have very limited value in predicting cancer risk (p. 16; 47). Some have inferred from this that short-term tests have little or no value, a misconception based on questionable interpretations of the message in the US National Toxicology Program report concerned (Tennant et al., 1987). These findings are only now receiving critical experimental reappraisal (pp. 16-17). The discussions generated are leading to a useful re-evaluation of the role of mutagenesis tests, a recognition of their limitations, and increasing attention to other in vitro toxicological procedures (p. 47-49).

The report emphasizes in several places that modification and improvement of the existing tests of both systems, and their use in a complementary manner (tier approach), offers the best immediate prospects of relief to many of the problems besetting regulatory toxicology.

Longer term solutions will require an increased and more focused research effort to develop alternative procedures, particularly in areas of in vitro toxicology other than mutagenesis. The development of tests for non-genotoxic carcinogens, such as metals, mineral fibres, and hormones, which present potential risk to Canadians, is a priority. The greatly prolonged tumour latent periods seen with many of these agents make their detection with rodent assays unsure (p. 49).

The present status of acute toxicity testing is considered in some detail:

- Validation studies on in vitro and modified animal tests are discussed in terms of objectives, criteria and problems encountered.

- There is a pressing need for firm international agreement on standards and criteria with regulatory commitment to accept properly validated tests (p. 17; 19).

- Several major validation studies are presently in progress, with appreciable support and input from international and national regulatory agencies (pp. 23-26).

- Appendix 1 concerns the international validation study on the Fixed Dose Test recently completed and accepted by OECD and CEC (p. 25).

- In Europe, the role of national and international regulatory agencies has been pre-eminent in coordinating and supporting validation studies (p. 59).

- US federal agencies are also participating in some international validation studies.

Validation studies on replacements and/or modifications to the eye irritancy test enjoy considerable industry participation and support in both Europe and North America (pp 30-33). An extensive annotated list of prospective alternatives to the eye irritancy test is presented (Appendix 4).

The Johns Hopkins University Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT) has shown particular leadership in the US (p. 39). Most of CAAT's $1.8 million annual budget supports in-house and extramural research and is subscribed by industry. In the public sector, research in in vitro toxicology in the US is spearheaded by the National Toxicology Program of NIEHS, which allocated $17.7 million or 22% of its budget to alternatives research and validation in 1988 (p. 50).

The impressive research programs at several European laboratories are described in some detail (pp. 54-59).

European associations for the chemical and pharmaceutical industries actively encourage the development of alternative procedures in toxicological testing. The former (ECETOC) through a technical monograph series and the latter (EFPIA) through a biannual 25,000 S.Fr. research award. "Alternative Methods to Animal Experimentation" was the designated subject for both the 1986 and 1988 awards competitions (p. 60).

The activities of a number of international and national professional animal welfare organizations that have ongoing constructive programs in support of alternatives research are discussed (p. 61-62).

Regulatory requirements and testing guidelines, under in-depth review by both Health and Welfare Canada and Agriculture Canada, are discussed (Chapter 7). The limited but encouraging trends in in vitro toxicology research at the HPB laboratories in Canada are described (Chapter 11). Other initiatives include those of the recently established Canadian Network Of Toxicology Centres (p. 68) and the exemplary seven year old University of British Columbia-British Columbia SPCA venture in matching support of alternatives research (p. 71).

Fully validated replacement tests (as opposed to reduction by test modification and/or the complementary use of in vitro/in vivo systems) are rare. The LAL test (Horse-shoe crab amoebocyte lysate) replacement for rabbits in pyrogen testing, a tissue culture assay for Yellow Fever vaccine potency, an HPLC test to replace the mouse in insulin batch tests, and a Rabies Tissue Culture Infection Test for diagnosing that disease in human contact animals are among the examples cited. The last-named test saves 30,000 mice annually in Canada, while the mouse convulsion test for insulin used 600 mice per batch.

NSERC strategic grants in environmental toxicology are essentially the only Canadian programs under which funding for the development of in vitro toxicology testing procedures may on occasion be available (p. 70). There is a clear lack of adequate financial support for either research or validation studies in in vitro or modified traditional toxicology procedures (p. 14-15). It is suggested that the chemicals industry should play a more aggressive role in this regard. The PMAC established a research foundation in 1989 which may have a positive impact on toxicological methods research and development.

Emphasis is placed on the important trend toward international harmonization of regulatory requirements and guidelines. That this is of particular significance between trading partners is exemplified by the heroic efforts in this direction within the European community (pp. 25-26). Harmonization should also be of immediate concern to Canada in the light of free trade with the US (p. 71).

The leadership role of the NTP and related research groups in the US and of regulatory agency scientists in Europe are shown as a major influence on the present progressive trends in alternatives research. The report particularly commends the leadership shown by the regulatory agencies of several European countries in organizing and supporting both research and validation studies. The virtual absence to date of such leadership in Canada is noted.

1.0 Introduction

The primary purposes of toxicological testing are the protection of human health and the safeguarding of the environment from excessive manmade contamination. Responsibility for setting safety standards and monitoring their implementation in Canada, as in most other countries, lies largely with the federal departments of health, agriculture, and the environment.

Implicit in this regulatory mandate is a responsibility for assuring that the most appropriate procedures are advocated, accepted, and used for the achievement of these goals.

Traditionally, such regulatory decisions have relied almost exclusively, and with little contention, on the utilization and interpretation of traditional toxicological tests using animals. Such tests were carried out by or on behalf of the manufacturer whose responsibility it is to demonstrate the safety of his product. The protocols submitted and the tests performed in support of these applications, not surprisingly, tended to adhere closely to the guideline suggestions of the regulatory agency or agencies concerned.

The past several decades, however, have seen a progressive and unprecedented escalation in the number and diversity of chemical, physical, and bioengineering products entering the market. This influx has been paralleled by a steadily increasing public interest in, and media coverage of, environmental and health matters, as well as concern over the means used to safeguard these conditions. A particular focus of this concern has been the use of animals in testing.

It might seem that these situations simply call for an appropriate increase in the existing toxicological testing programs and for closer monitoring, both of environmental pollution and the care of laboratory animals. However, even a cursory review of the facts as outlined below makes it abundantly clear that these moves alone cannot resolve this situation. The time would seem to have arrived for a thorough review of our current toxicological testing strategies and, in the process, of the status and potential role of the many new methodologies and modifications to traditional test procedures that are becoming available.

2.0 Toxicological Testing

2.1 Basis and Applications

Methodologies in toxicological testing are either mechanistic or descriptive. The former is concerned with identifying the metabolism and pharmacokinesis leading to a toxic event; the latter is based on the observable pathological and physiological changes resulting from exposure. Classification relies on quantitative estimates of the changes between test and control groups.

Regulatory assessment of risk has usually been based on descriptive toxicological data derived from traditional animal test procedures. On the other hand, the mechanisms involved in toxicological events have most often been considered in the development of in vitro methodologies. The demonstration of the involvement of comparable mechanisms provides the only sound (scientific) basis for extrapolation from one species to another.

Where human toxicity data are lacking, extrapolations from descriptive animal test results have had to be rationalized on rough estimates of similarity between the experimental animal and humans. Factors such as known common physiological pathways and the closeness of their biological relationship are considered.

Obviously, extrapolations will be greatly enhanced where the mechanism involved in an event is understood. This in itself would seem a strong argument for the combined utilization of the data from whole animal and in vitro tests in regulatory risk assessment. The rapid expansion of information at the molecular level bearing on the mechanisms involved in cytotoxic damage, mutagenesis, and carcinogenesis should make the use of cellular, genetic, and other in vitro toxicology data increasingly valuable.

Most industrial toxicology test procedures are undertaken to meet government regulatory requirements and/or guidelines or to pre-screen candidate formulations for product development. The ultimate goals are: the demonstration of safety limits, product registration, public acceptance, and safeguards against product liability.

Regulatory requirements are a national prerogative. Consequently, the pharmacological profile of an industrial product for export must conform to the requirements of each of its importing countries. The result has been adherence to highly standardized experimental protocols and great difficulty in modifying, let alone replacing, any officially prescribed test. However, progress is being made toward modifying national requirements. There is a perceptible trend toward harmonizing these, particularly within groups of trading partners.

2.2 The Chemicals Log Jam

There has been an exponential increase in the number of chemicals, including drugs, entering the market over the past several decades. At present, there are well over a million chemicals world-wide. Some 70,000 are in regular use in North America (NAS-NRC, 1984). New chemical entities are being added at a rate approaching 1,000 per year throughout the world (Upton, 1986). Since World War II, the production of synthetic chemicals has increased 350-fold (NAS-NRC, 1984). Recently a whole new spectrum of products of biotechnology has entered the marketplace. Unfortunately, all of these represent continuing trends tied to expanding populations and ever more potentially lucrative markets. There seems little immediate likelihood of supply saturating demand. It is indeed fortunate that a majority of these entities are not likely to affect human health adversely and that exposure to them will often be limited. However, it is evident that exposure to rare or low volume toxic products may, in specific situations, constitute a significant health problem (Silano et al., 1986).

2.3 Adequacy of Toxicological Information Available

The majority of the 70,000 or so chemicals in use in North America do not have anything approaching adequate toxicological profiles. A National Academy of Sciences (NAS-NRC, 1984) report based on 53,500 distinct chemical entities (including 2,000 drugs) for which machine retrievable data were available studied samples from the following five chemical categories:

- drugs and excipients in drug formulations;
- pesticides and inert ingredients of pesticide formulations;
- food additives;
- cosmetic ingredients; and
- chemicals in commerce (sub-categorized by annual production quantities).

Each compound was evaluated according to the appropriate United States national and international regulatory guidelines. In the majority of cases, the available information was found to be both quantitatively and qualitatively insufficient for a proper health risk assessment.

The comparative inadequacies of these available data, surprisingly even for drugs and pesticides, is clearly indicated in Figure 1.

Thus, even among drugs and pesticides, only slightly over one-third of the products sampled had enough data available for a complete or partial health hazard assessment. Among data least available in all categories were those for long-term tests for carcinogenicity, teratogenicity, and inhalation toxicity studies. Data for acute oral and parenteral studies were far more numerous.

Table II gives the percentages of substances in each chemical category for which minimal animal toxicity data are available and for which no data were retrieved.

FIGURE I

ADEQUACY OF AVAILABLE TOXICITY DATA FOR ASSESSMENT OF HEALTH-HAZARDS OF SUBSTANCES IN DIFFERENT CATEGORIES OF USAGE

Category	Size of Category	Estimated Percent in the Select Universe
Pesticides and Inert Ingredients of Pesticide Formulations	3,350	10 24 2 26 38
Cosmetic Ingredients	3,410	2 14 10 18 56
Drugs and Excipients Used in Drug Formulations	1,815	18 18 3 36 25
Food Additives	8,627	5 14 1 34 46
Chemicals in Commerce: At least 1 Million Pounds/Year	12,860	11 11 78
Chemicals in Commerce: Less than 1 Million Pounds/Year	13,911	12 12 76
Chemicals in Commerce: Production Unknown or Inacessible	21,752	10 8 82

Complete Health Hazard Assessment Possible	Partial Health Hazard Assessment Possible	Minimal Toxicity Information Available	Some Toxicity Information Available (But below Minimal)	No Toxicity Information Available

Source NAS-NRC 1984

TABLE II

ESTIMATED PERCENTAGES OF SUBSTANCES FOR WHICH DATA ARE AVAILABLE FROM FIVE BASIC TYPES OF TESTS (NAS—NRC, 1984)

Chemical Category	Sample Size	Percentage with Prescribed Test Data					Percentage with Minimal Toxicity Information	Percentage with No Toxicity Information
		Acute	Subchronic	Chronic	Reproductive or Developmental Biology	Mutagenicity		
Pesticide and inert ingredients of pesticide formulations	106	59	51	23	34	28	36	38
Cosmetic ingredients	162	39	29	16	22	23	26	56
Drugs and excipients in drug formulations	95	75	62	39	45	32	39	25
Food additives	212	42	34	13	20	23	20	46
Chemicals in commerce, with production:								
1 million lb/yr	259	20	10	4	6	9	22	78
1 million lb/yr	136	22	8	3	4	10	24	76
unknown	136	15	7	3	7	8	18	82

These values are based on search strategy used to identify prescribed minimal toxicity information on substances in preliminary sample of 675. This strategy was not exhaustive; hence, additional information may exist in files of industries, government agencies, and other institutions.

From Upton, A.C. (1986)

3.0 Animal Testing: Comments and Problems

There is no question that toxicological test procedures which use animals are -- and will continue to be -- necessary for the foreseeable future. Nevertheless, such tests, although often the best safeguard available, are far from foolproof. They are often difficult, if not impossible, to carry out properly. Some of these shortcomings and problems are reviewed below.

3.1 Costs of Testing (Money and Time)

The US Office of Technology Assessment Report on Alternatives to Animal Use in Research, Testing and Education (OTA, 1986) devotes a chapter to economic considerations. Several of the comments in that section are disturbing. For example, new chemicals are entering the US market in numbers approaching 500 per annum but the capacity to test these fully, using present procedures and meeting regulatory requirements, is at best 200. This results in a North American shortfall of no fewer than 300 chemicals yearly being added to the already staggering deficit.

The Office of Toxic Substances (OTS) within the US Environmental Protection Agency (EPA) has stated that it is illogical and unrealistic to expect all 1,300 or more annual "new" chemical submissions to the EPA to receive a full toxicological analysis. OTS views screening assays as highly useful tools for assigning priorities for future standard methodologies testing (Francis and Farland, 1987). In fact, the situation would seem to call for even more extended decision making based on short-term screening tests than that advocated by OTS, along with a more aggressive approach to in vitro toxicology R&D.

The average estimated cost per chemical of a rodent bioassay for carcinogenicity is in the range of $1 million and takes from two to three years to complete.

Based on these factors alone, the economic case for using carefully selected short term in vitro tests for the pre-screening of chemicals, at least for interim regulatory purposes, is a very strong one indeed (Lave et al., 1988).

A potential problem arising from the use of short-term in vitro pre-screening is that screening several thousands of previously untested chemicals by rapid, inexpensive short-term tests would undoubtedly turn up a fairly large number of potentially carcinogenic compounds. These, in turn, would presumably require long-term confirmatory testing on animals, the implementation of which would, in fact, probably be logistically next to impossible (McCormick, 1987). This impasse might be avoided by firm adherence to an advance regulatory decision on the action to be taken based on the battery of short-term test results available. Stringent labelling, transport, emission regulations, and worker safety measures in the case of industrial chemicals would also be likely to lower the risk to acceptable limits while a search for safer alternative chemicals was carried out (Balls, 1987).

3.2 Weighting Information of a Lesser Quality

The present insistence on time-consuming and expensive test regimens means that relatively few chemicals can be tested. Not collecting information implies a decision of no action which could prove extremely costly if the chemical is a potent carcinogen (Lave, 1986). As that report points out, finding a heretofore unsuspected chemical to be highly toxic has, unfortunately, become an uncomfortably frequent occurrence, e.g., vinyl chloride monomer. Fortunately, this is much less likely to occur with drugs, as all new drug protocols must be approved by what are sometimes criticized as overly cautious and demanding regulatory agencies. Nevertheless, errors of judgement have occurred in the past (e.g., Thalidomide) and still do occur. There are also many older prescription and non-prescription drugs on the market for which the data would not fully meet present standards. There is no question that information from short-term tests can be very helpful in the decision making process, particularly in the reviewing of substances already on the market for which there are inadequate data available.

3.3 Ethical Considerations

This report is not the place for a detailed discussion of the many-sided and all too often emotional, rather than reasoned, arguments for and against the use of animals in testing (or for that matter in research, of which testing is so often a vital part). The above comment notwithstanding, the subject must be briefly considered since public opinion on this issue represents a significant source of pressure felt at all levels of the biomedical community concerned in research testing.

The "necessary" use of animals in the protection of human safety, for the health of other domestic and wild animals, and in protection of the environment is accepted by a great majority of persons. It is also universally agreed that laboratory animals should not be made to suffer more than necessary. The problem, of course, lies in defining and agreeing upon the limits of necessity.

Certainly, continuing pressures will be exerted on politicians and decision makers in government, industry, and academia to assure that animal use in testing is governed by "conceived necessity," and that their numbers and suffering be held to a minimum. The statement that "in our dealings with animals we have obligations that do not arise from claims on us based on rights" (Cohen, 1986) is a view with which few, if any, toxicologists would disagree. Similarly, most would agree that, when feasible, the use of lower evolutionary forms of life is ethically preferable to the use of warm-blooded animals. Among the latter, embryonated hen's eggs, rodents, and other animals raised for the purpose should be used in preference to other less common and prolific species. Any use of rare species and of sub-human primates for testing purposes should be strongly discouraged and subject to absolute necessity and strict regulation.

Article 7 of the Council of Europe Directive of 24 November 1986 was cited by Balls (1987) and seems appropriate to the consideration of ethics in toxicity testing:

> When an experiment has to be performed, the choice of species shall be carefully considered and where necessary explained to the authority. In a choice between experiments those which use the minimum number of animals with the lowest degree of neurophysiological sensitivity, cause the least pain, suffering, distress or lasting harm and are most likely to provide satisfactory results shall be selected.

3.4 Reliability of the Rodent Bioassay

It was barely 100 years ago that hazardous chemicals, harmful ingredients in foods, and other toxic insults were identified through the responses they elicited in humans (vomiting, acute irritation, sickness, and even death). With advances in pharmacology and medical knowledge came the gradual evolution of our current concepts of toxicity testing. These in turn resulted in regulatory toxicology, safety testing, and risk assessment as recognized today.

Tests such as the LD50 and Draize skin and eye irritancy tests were introduced about 50 years ago. Although acute toxicity tests are not necessarily required by law, other than for drugs and pesticides, these procedures have been used increasingly because of tradition, in response to consumer awareness, and because of potential product liability (Goldberg, 1986).

The vast preponderance of the toxicity tests used for regulatory purposes today are whole animal assays, most commonly rodent bioassays. Few if any in vitro toxicology test procedures are older than 15 years, with most genetic toxicology testing dating back to the reverse mutation Salmonella/microsome test (Ames et al., 1975).

While the rodent bioassay tests have generally been very effective in protecting the public from both acute and long-term chemical hazards, they have by no means always proven adequate as predictors of human risk. An example of this is the apparent lack of a carcinogenic effect in 121 humans, after 30 years, from tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) following an accidental exposure dose sufficient to induce acute and sub-chronic toxic symptoms (Zack and Suskind, 1980). This despite the fact that TCDD is one of the most potent liver and skin tumour promoting agents known in rats and mice (Abernethy and Boreiko, 1987). The disturbing corollary that arises from this report is: are there potent human carcinogens of which we are unaware because they are inactive in rodent bioassays? (Butterworth, 1987).

The possibility of false negative tests allowing a seriously harmful item onto the marketplace is always present and is one of the reasons that testing is often required in multiple species, both sexes, etc.

Extrapolations from rodent to humans and vice versa in the absence of supporting epidemiological evidence or data implicating a common toxicological mechanism (very often based on in vitro studies) must always be made with reservations. There are a number of well known examples that underscore this point, such as the sensitivity of the rodent fetus to the cortico-steroid induction of cleft palate, to which other mammalian feti, including those of humans, are not susceptible.
Conversely, human feti are many times more sensitive to Thalidomide than are those of the rabbit.

4.0 Alternative Testing: Comments and Problems

4.1 Animal Welfare Influence

There is no doubt that the animal welfare lobby has influenced and will continue to influence the development and adoption of in vitro and modified traditional procedures through publicity, political pressure, and the financial support of R&D "alternatives".

To date, almost all the development of alternatives has arisen out of biomedical research in which the new or modified methodology was an incidental rather than a primary product. This situation and these attitudes appear to be changing, at least internationally, as the discipline of in vitro toxicology and the concept of alternative procedures and test modification to reduce animal use in toxicological testing become progressively better established in their own right. This is particularly apparent in the European nations in which animal welfare and political pressures (Green movement, etc.) are strongest.

A number of studies and reports have recently been published in the US in response to both federal and state legislature requests for reviews on the use of animals in testing (NRC, 1988) and for reports on alternative methodologies (OTA, 1986; University of California 1988).

These reports correctly emphasize that animal testing will continue to be needed and will be used in the foreseeable future. They further stress that efforts should and will continue to be made to develop effective alternatives. In this regard, the most immediate progress in reducing animal use is generally accepted to lie in the modification of traditional testing methods to use fewer animals in better (i.e., less stressful) ways. All such reports rightly emphasize the dangers to biomedical progress and public safety that will arise if overly restrictive legislation should be introduced in a knee-jerk response of political expediency.

4.2 Funding

Much of the financial support for in vitro and alternative methods research in the US and Europe comes from industry. This reflects a response to animal welfare pressure as well as to economic reality. To date, Canadian industry has not responded comparably. The chronic low level of industry funding of Canadian research, including that in toxicology, persists despite the presence of a lucrative Canadian market for the products of those industries.

A major impediment to progress in applied research at Canadian universities in general, and the development of in vitro toxicology procedures in particular, may lie in the ambivalence of our major granting agencies toward funding such projects. Thus, in correspondence on this matter, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) has pointed out their encouragement of the use of alternatives to laboratory animals (NSERC Awards Guide, paragraph 16) and that "research activities aimed at developing alternatives to the use of laboratory animals are eligible for support through the regular research grants programmes. While NSERC has not earmarked funds for this

purpose, there is nothing to preclude university researchers (from doing so)." Regarding researchers developing "alternatives" as part of their ongoing research programs, the same guide states: "The development of an alternative is not necessarily the aim of the programme, but a by-product. Further exploitation of an alternative technology for research and/or testing is left up to the researcher." Unfortunately, these provisions do not allow for the full development of a method and its validation as required for regulatory acceptance. Furthermore, there is no sign that the government regulatory agencies involved are prepared to accept this challenge, as such agencies have in several European countries with considerable success. A senior representative of the Medical Research Council (MRC) indicated that his council adhered to essentially the same policy. It should be pointed out that NSERC has other programs in place that are somewhat more open to the support of applied research. These are referred to under Research Grants (p. 69).

Within less than a decade, centres devoted to in vitro toxicology have come into being in the US They include laboratories at Rockefeller University, the Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT) at Johns Hopkins University, and the National Toxicology Program (NTP) under the National Institute for Environmental Health Sciences (NIEHS).

Several European institutes of equal relative prominence are also playing a major role, both in developing new in vitro procedures and in spearheading validation studies. Again, there is no question that the development and, in most instances, the funding of these institutions have been positively influenced by the public concern expressed on this issue.

No comparable Canadian institute has been established and existing university affiliated research units devoted primarily to in vitro toxicology related studies have experienced chronic funding problems. The recently established Joseph F. Morgan Research Foundation is intended to address the latter problem by encouraging greater industry research support to these ends.

4.3 False Positives in Short-Term Assays

A report on 73 chemicals (Tennant et al., 1987) identified by them or in a previous NTP study (Shelby and Stasiewicz, 1984), as being non-carcinogens, indicated that 25 of the 73 could be classified as "false positives" (i.e., mutagenic but not carcinogenic). This report, or at least the "false positive" figures which are often taken out of context and accepted uncritically, has thrown considerable doubt on the predictive value of the S. typhimurium assay. The Tennant report, possibly fortunately, marked the end of a decade of in vitro test euphoria which had resulted in the proliferation of well over 100 short-term mutagenicity tests involving micro-organisms, cell cultures, and whole animals, most with little or no acceptable validation data.

The S. typhimurium test (Ames et al., 1975) is the most widely used short-term test partly because it is inexpensive and rapid. The primary reason, however, is the numerous published positive correlations between it and rodent bioassays for carcinogenicity. It also comes closest to having fulfilled the criteria for validation (p. 17).

If the Tennant et al. (1987) frequency of "false positives" is a true reflection of the situation for all non-carcinogens, one can seriously question the usefulness of the S. typhimurium assay for screening chemicals for carcinogenicity. By implication, all other short-term tests for carcinogenic potential based on mutagenicity must also be questioned.

4.4 Genotoxicity Testing

Tennant et al. sent out two conflicting signals: (1) that any expectations that either single or batteries of short-term tests might replace long-term rodent bioassays should be abandoned; and (2) that such tests had an important health role to play in identifying genotoxicants and potential carcinogens that may exert their effect through somatic mutation. It has been aptly pointed out that although two signals were sent out, only one was received by many readers, namely "that short-term tests are of limited (or no) value for identifying rodent (and, by inference, human) carcinogens and non-carcinogens" (Brockman and De Marini, 1988). These investigators go on to urge caution in generalizing from the specific conclusions of Tennant et al.

An extensive re-evaluation of the mutagenicity and carcinogenicity of the chemicals identified as "false positive" in the S. typhimurium mutagenicity assay has been reported recently in several reviews. The authors have found reasons for clarifying the message and have demonstrated that the carcinogenicity (animal) data can create just as many difficulties and uncertainties as the mutagenicity data, if not more (Prival and Dunkel, 1989).

In the context of attitudes within both the regulatory and the research community, these critical re-evaluations are of considerable importance and therefore deserve to be discussed here in some detail.

A major limitation of early correlation studies was the reliability of the classification of chemicals as non-carcinogenic. Inadequate carcinogenicity bioassays made it very difficult to prepare a list of definitive non-carcinogens.

The early National Cancer Institute (NCI) carcinogenesis bioassay program, continued by the National Toxicology Program (NTP), uses a standard protocol considered adequate to discriminate between carcinogens and non-carcinogens. Using 60 chemicals considered non-carcinogens under these conditions (Shelby and Stasiewicz, 1984) found 22 (37%) to be mutagenic "false positive". Tennant et al. (1987) added four more "false positives" from among 29 further non-carcinogens (a 14% "false positive" incidence).

These NTP testing chemicals have been widely utilized by others as a source of established non-carcinogens for validation studies on short-term tests.

The re-evaluation by Prival and Dunkel showed that the S. typhimurium assay specificity was greatly enhanced by the use of more stringent criteria for mutagenesis. In addition, the effect of the same criteria on the incidence of "true positives" was a reduction in sensitivity (i.e., a lesser number of mutagenic carcinogens).

Re-evaluation of the carcinogenicity data showed that of these 25 S. typhimurium "false positives" (mutagens amongst non-carcinogens), two were definitively non-carcinogenic in two rodent species. Two other chemicals were, in fact, carcinogens and 21 showed some serious inadequacy preventing their definitive classification.

The discrepancy between 37% and 14% false positives on the two NTP studies was said to "indicate the high degree of uncertainty associated with any such correlation studies." Re-evaluation suggested that a major possible source of discrepancy might lie in the presence of impurities at a level affecting mutagenesis but insufficient to be expressed in whole animal assays. (Such impurities may be carcinogenic as well as mutagenic.) A 2% chemical impurity, while unlikely to contain enough carcinogen to affect a whole animal response when tested at 1000 mg per plate, is equivalent to 20 mg of impurity per animal. This concentration would usually be sufficient to cause a readily detectable "positive" mutagenic response. That a number of the mutagenically positive chemicals showed significant increases only at doses of the 1000 mg per plate level or higher seems to support this possibility.

This and other reports have emphasized the extreme difficulty in establishing an adequate list of non-carcinogenic compounds for validation and suggest that "in the end the only way to validate short-term tests may be by demonstrating that the effects observed in the short-term test result from a mechanism of action sufficiently similar to one that can trigger the carcinogenic process in vivo."

4.5 Validation

Reductions in the number of animals needed and refinements to existing protocols that reduce stress and pain must necessarily be evaluated to ascertain that they do not diminish the predictive capacity of the traditional test on which they are based. Where a pre-existing procedure has been accepted for specific predictive purposes, the evaluation is a straightforward procedure of comparing results. Such studies should be done blind, using several chemicals representative of different chemical classes and, ideally, should involve several laboratories using the same strains of test animals, cell lines, etc. Comparisons are then made with the results of a parallel set of tests using the standard or traditional procedure.

Validation of an in vitro or any other complete replacement procedure is, however, much more complex. According to Goldberg (1986), the major steps in the process are: (1) standardization and transfer of technology; (2) the identification of a "gold" standard for evaluation; (3) understanding the importance of a mechanistic basis; (4) defining the chemical classes; and (5) initiating a data base. In vitro toxicology methods are relatively new and often innovative. They are coming to play an ever more important role in risk assessment, albeit rather slowly. Such methods must of necessity be evaluated against a standard. Ideally, as the risk assessment for which they are to provide data concerns human safety, the standard should be based on human responses. Unfortunately, there are rarely adequate firm human data to permit this. The International Agency for Research on Cancer (IARC, 1987) lists only 26 chemicals or chemical classes as confirmed human carcinogens. Therefore, we must ask: "What should our gold standardbe?" (Goldberg, 1986). And if, of necessity, we use a standard of lesser reliability, what reservations should we place on comparisons or evaluations based on it?

Because of the abundance of rodent bioassay data available for toxicological tests such as that for carcinogencity, rat or mouse data has, by default, become the in vitro alternative test validation "gold" standard, although not without some reservations (Clayson, 1987; Ames et al., 1987).

Critical attention has been drawn to the uncertainty of the results obtained from the rodent bioassay for carcinogencity (Lave et al., 1988). Based on a US National Toxicology Program study on rats and mice, 50% of 214 chemicals were positive potential carcinogens in each species. Concordance between the species, however, was only 70% (i.e., both species positive or both negative) for these chemicals. Lave et al. (1988) comment: "How many chemicals that cause tumours in rodents are human carcinogens? Extrapolating from one species to another is fraught with uncertainty. Nevertheless rats and mice are more similar biologically to each other than either is to humans." They go on to point out that the inter-rodent species 70% concordance probably constitutes an upper limit for any rodent/human concordance. This assumption is supported by the fact that 19 of 20 probable human non-carcinogens were positive in rodent bioassays (Ennever et al., 1987).

The rodent bioassay has given positive results in one or another species for essentially all known human carcinogens and on that basis it shows absolute sensitivity. However, an assessment of its true usefulness also depends on its ability to discriminate. The proportion of non-carcinogens found to be negative must be considered as well as the proportion of carcinogens found to be positive. On this basis one cannot help but query the validity of the rodent bioassay as the "gold" standard for validation of in vitro alternatives, even though it may be the "best we've got."

Comparisons using the rodent assay as standard should always be analyzed critically and generalizations made only with considerable care, even trepidation. The point made in the recently released report on the use of laboratory animals (NRC, 1988, p. 45) on the usefulness of a four test battery of short-term tests for predicting carcinogencity, namely "that four such tests were shown to have a concordance of only 60 percent with rodent carcinogencity tests," may be viewed as a not so serious indictment in the light of the above comments.

4.6 Regulatory Acceptance

One of the conclusions drawn from a 1986 seminar sponsored by the OECD chemicals group on Chemical Testing and Animal Welfare was that "there is a need for fast and better dialogue between scientists and regulators" (Lonngren, 1986). Obviously, such dialogue is essential if the technology transfer from the research laboratory to validation study to regulatory acceptance is to be completed.

There is a common reluctance among regulators to adopt new test methodologies, in part because of the considerable time and effort it has usually taken to get approval of the testing procedures presently used. This reluctance or conservatism has been corroborated by no less an authority than the US Regulatory Reporter (Anon, 1988), which states, "The evolution of the Food and Drug Administration's (FDA) non-clinical animal testing requirements is a slow, some would say, imperceptible process. Agency toxicologists and pharmacologists are not anxious to revise or surrender the tests with which they are most comfortable in predicting the toxic effects that potential therapeutic agents may have in man."

Safeguards are by definition precautions which, again by definition, imply caution (conservatism). Undoubtedly, conservatism is a necessary regulatory trait, but there is no reason to equate this with rigidity of mind set. There is no doubt that a test modification or in vitro procedure will be accepted by the regulatory authorities, if it can be clearly shown to be at least as predictive as its traditional counterpart while offering advantages of economy, avoidance or reduction of animal use, etc. One example is the acceptance of the Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) test for bacterial endotoxins (pyrogens) as a replacement for the rabbit pyrogen test by OECD and numerous national agencies including US Pharmacopea and the Bureau of Biologics, Health Protection Branch, Canada.

However, acceptance may be passive rather than active. It behooves a regulatory authority, once it has accepted a replacement or modification of a traditional test for cause, to actively encourage the use of the newly accepted procedure and discourage new submissions based on the original (replaceable) test. It may be appropriate to suggest that regulatory guidelines should indicate what they do not want, as well as what they do want.

The same issue of the US Regulatory Reporter quoted above goes on to say that "validation will continue to be a key issue as the (US) scientific community looks to the FDA for guidance on what validation criteria need to be met to make in vitro tests viable testing alternatives."

This suggestion that major national human health regulatory agencies have an obligation to give leadership in test methodologies development, or at least in their validation, seems to have been accepted by government agencies in a number of countries, e.g., UK Department of Health and Social Services, (DHSS), Federal Republic of Germany's Bundesgesundheitsamt (BHS).

A recently established CAAT committee (Johns Hopkins University) suggested that active acceptance requires that validation studies be designed and carried out with input and cooperation from the regulatory authority most closely identified with the objectives of the replacement test. In addition, the process of validation of the test in question should be defined by an advisory or coordinating group, again with regulatory input.

These suggestions seem to be similar to the practice now being implemented in several ongoing European studies. These involve national agencies and are often coordinated or sponsored by the CEC, OECD and various national government agencies. To be successful, initiatives of this sort need both a catalyst and a clear-cut focus. The lack of one or both of these requirements may explain the relative lack of substantive progress toward development, validation or acceptance of these technologies to date in Canada. These international trends would suggest that it may well be time to modify the traditionally ultra-conservative characteristics of Canadian regulatory policy to one of leadership.

5.0 Acute Toxicity

Public health authorities and toxicologists have an obligation to protect the public against acute poisoning. That the danger of acute intoxication in the workplace is still very much a reality is borne out by the periodic occurrence of such disasters as Bhopal. Additionally, individual accidental poisonings continue to occur in considerable, if not increasing, numbers through drug overdose, food contamination, and the misuse of household and commercial chemicals. A further and expanding obligation is that of monitoring industrial wastes against the endangerment of our environment and its human and animal inhabitants.

5.1 Median Lethal Dose Test (LD50)

The traditional LD50, or median lethal dose test, subjects rather large numbers of animals (five or more of each sex) to a range of dose levels (usually five) in order to calculate the median lethal dose. This test has been adopted as the preferred acute toxicity test in national and international regulatory guidelines. Despite its limitations (Table III), it was, until recently, the only such referred to in these guidelines.

The LD50 procedure was first introduced over 60 years ago (Trevan, 1927) to provide a toxicity measurement having a precise, easily determined biological end-point, namely 50% mortality. Initially, it was intended and used for the standardization of highly toxic biologicals (digitalis, insulin, etc.). Subsequently, the test became the major acute toxicological test internationally. It has been used universally to provide the toxicological basis for the classification of hazardous chemicals, labelling, and other purposes, although it is less well suited to these ends (Zbinden, 1986).

There has been agreement among a great majority of scientists and impartial committees reviewing the pros and cons of the LD50 that there is a definite need for numerical estimates of toxicity based on an unequivocal, simple-unit end-point (Home Office UK, 1979; Zbinden, 1984).

TABLE III

SHORTCOMINGS OF THE LD50 TEST

- The numerical value of the LD50 is not a biological constant. It is highly influenced by endogenous and exogenous factors.
- The LD50 test considers mortality and neglects morbidity.
- The LD50 determined in animals has little predictive value for the lethal dose in man.
- Comparison of the LD50 in newborn and mature rodents is not a reliable method for detecting special risks in human neonates.
- The LD50 does not provide a reliable basis for dose selection in repeated-dose toxicity studies.
- Determination of combined LD50 is not an acceptable method for risk assessment of drug combinations.
- Comparison of LD50 by oral and parenteral administration is a wasteful and unreliable method for assessing bioavailability.
- The use of LD50 values as a basis for classification of hazardous substances neglects many properties worthy of consideration. Moreover, various countries use different classification criteria.
- In the LD50 test, some of the animals are subjected to extreme pain and distress.

Source: Zbinden (1986)

5.2 Classification of Toxic Substances

In recent years, there has been general agreement among toxicologists that this measure (LD50) does not need to be precisely determined with statistical significance to serve the purposes of classification.

The fact that the LD50 is the basis on which most tested pesticides, chemicals, etc., have been classified has been an impediment to its replacement.

Recently, modifications to this and other acute toxicity test measures that do not use death as an end-point have come under serious consideration. Some of these are the subject of current major validation studies in Europe (pp. 25-26 and Appendix 1).

Although it is recognized that the LD50 can be influenced by numerous biological variables and experimental manipulations, and is certainly not a biologic constant, regulatory authorities have been reluctant to consider using other scientifically more meaningful measures. Interestingly, the LD50 constant has not eliminated differences in classifications systems for toxic chemicals between national authorities (Table IV).

5.3 Current Regulatory Trends

The objections of the animal welfare movement to the LD50 on ethical grounds are well founded, long standing, and well known. They need not be documented here.

Several current reviews have been highly critical of the LD50 procedure on scientific grounds (Home Office UK, 1979; Zbinden and Flury-Roversi, 1981; ECETOC, 1985). Professional societies of toxicologists, such as the Society of Toxicology of Canada, have also issued position papers critical of the excessive use and assumed value of this test (see Appendix 2).

The development and validation of acute toxicity methods that will be acceptable to national regulatory authorities has a high R&D priority and enjoys the almost unanimous support of professional toxicologists. However, presuming national regulatory acceptance of a modified LD50 or preferably a non-lethal replacement (as per Appendix 1), further hurdles will remain to be cleared. The problems of international implementation and harmonization of classification requirements between countries will remain. In these matters, the good offices of such organizations as the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) and International Programme for Chemical Safety (IPCS) will undoubtedly prove to be invaluable.

A major fear is that if a more scientific measure replaced the LD50 as a classification criterion, the legal base would become uncertain and lead to immense industry-government problems over reclassification.

TABLE IV

CRITERIA FOR CLASSIFICATION OF TOXIC CHEMICALS (LD50 ORAL)

Canada	United Nations	EEC Norway Sweden	US Consumer Protection Label	Swiss Toxic Substance Label	Japan. Toxic and Delet. Subst. Label
very toxic <50 mg/kg	Group I 5 mg/kg Group II 5-50 mg/kg	very toxic 25 mg/kg	highly toxic 50 mg/kg	Category I 5 mg/kg Category II 5-50 mg/kg	Toxic Subst. 30 mg/kg
toxic 50-500 mg/kg	Group III 50-500 mg/kg (solids) 500-2000 mg/kg (liquids)	toxic 25/200 mg/kg harmful 200-2000 mg/kg		Category III 50-500 mg/kg Category IV 500-2000 mg/kg (products) 500-5000 (substances) Category V 2000 mg/kg (products) 5000-15000 mg/kg (substances)	Deleterious 30-300 mg/kg

Adapted from: Zbinden (1986)

5.3.1 OECD Guideline Update (1987) Proposals (1989-1990)

OECD has updated its Testing Guidelines 401 and 402 for acute oral and dermal toxicity (1986), providing for:

- a reduced oral limit test dose to 2000 mg/kg from 5000 mg/kg;
- full tests on one sex only, with confirmatory testing on a small number from the other sex; and
- tests performed on higher mammals, such as dogs, should use small numbers and should not exceed moderately toxic doses.

The updated guidelines also state: "Doses known to cause marked pain or distress due to corrosive or severe irritant actions need not be administered, even when no mortality has been observed at tolerated doses."

In the fall of 1988, the OECD Chemical Group, Management Committee, announced its intention to prepare a detailed review paper on the results of an international validation study on the Fixed Dose Procedure for Acute Oral Toxicity Testing developed by the British Toxicological Society.

This study (Appendix 1) involved 33 laboratories in 11 countries and assessed 20 chemicals ranging from very toxic to relatively innocuous. Results were reported at an OECD seminar, "LD50 and Classifications Schemes - The Possibilities for Change," held in Brussels in September 1989. At the seminar, validation study findings for fixed dose methods developed in the United Kingdom and in West Germany were reviewed. Some potential in vitro alternatives were also discussed; however, as validation of these replacement procedures has not been successful, it was agreed that whole animal tests for acute toxicity cannot be replaced at present. Significant reductions and refinements can and should be achieved through use of the Fixed Dose Procedure, however. Acceptance of this procedure is being urged by both OECD and CEC and a proposal for a new guideline, "Acute Oral Toxicity, Fixed Dose Method," is currently being considered by the OECD Updating Panel.

5.3.2 European Economic Community

A 1987 Note for Guidance Concerning Marketing Authorization for a New Drug makes the point that an accurate (full) LD50 does not need to be determined. A quantitative evaluation of the approximate lethal dose and dose-effect relationships should be made, but a high level of precision is not required. "Toxicologists should make their best judgements in designing the studies so that the maximum amount of relevant information is obtained from the smallest number of animals." (Annex to Directive 75/318/EEC Part 2, Chap. 1(b)(1)) This position has been significantly enhanced by the CEC statement of September 1989 (Table V).

Article 23 of the Council Directive of November 24, 1986, requires member states to encourage research into the development and validation of alternative techniques. Apparently, the Community has advance plans for the establishment of a Centre for Research on Alternative Toxicology Testing Procedures (personal communication from M. Patrick Murphy of CEC).

Although there are procedures which are ethically more acceptable as well as scientifically equal or more sound than the LD50, their adoption by regulatory agencies is dependent on agreement to their acceptance by most nations. A major initial step in that direction was taken at the OECD seminar in the statement issued by the Commission of the European Community (CEC), as shown in Table V.

5.3.3 European Industry's Position

The European pharmaceutical industry is irreversibly oriented toward possible alternatives to animal experimentation and has a double interest in developing in vitro methods. The first is scientific, to improve fundamental knowledge elucidating the pharmacological and toxicological mechanisms of action of active principles. The second is the ethical aim of reducing the use of laboratory animals (Cano, 1988).

The European Chemicals Industry Ecology and Toxicology Centre (ECETOC, 1985) Monograph #6 has made the following important points:

- LD50 and LC50 values do not define the toxicity of a substance, they merely index its lethal dose.
- Where the LD50 (LC50) is required by regulatory authorities...they should not specify a minimum number of animals.
- Basing classification systems on the LD50 (LC50) should be discouraged in favour of fixed dose procedures.
- Regulatory authorities should acknowledge that acute toxicity data may be unnecessary for the protection of human health from some products (e.g. those with certain physico-chemical properties). Standard arguments to cover these conditions should be developed and accepted internationally.

Since the publication of the ECETOC report, a number of significant regulatory changes reducing LD50 requirements have been promulgated internationally (OECD, CEC, etc.) and implemented by some countries. Canada and the US, both of which are OECD members, have recently indicated they intend to introduce similar regulatory modifications to the procedures and requirements for this test. It is to be hoped that both countries seriously consider following the lead of the CEC in the regulatory acceptance of a Fixed Dose Procedure (Table V).

TABLE V

COMMISSION STATEMENT ON LD50 AND CLASSIFICATION

During the discussions which have taken place in the framework of the Seminar "LD50 and Classifications Schemes - the Possibilities for Change" held in Brussels from 19 to 21 September 1989 it became evident that the existence of different schemes for the classification of dangerous substances and preparations within different countries, international organizations, and trading blocs constitutes a definite barrier to moving from traditional LD50 testing methods.

The Commission shares the opinion of the majority of the participants to the seminar that it is highly desirable to rationalize these classification schemes. It recognizes however that this is a medium-long term goal requiring a concerted effort in order to be met.

In order to make progress in this field, the Commission engages to take an initiative to evaluate the feasibility of such a rationalization. It will support financially the necessary preparatory work, and will formally invite all the OECD Member Countries as well as international organizations to become associated with this initiative.

Furthermore, recognizing that such an exercise may take several years to be completed, and considering that it is not justifiable to await the outcome of such an exercise before making progress towards the replacement for classification purposes of the traditional LD50 test by scientifically more valid and ethically more acceptable acute toxicity testing methods, the Commission:

- accepting that a fixed dose procedure which provides adequate toxicity data for classification labelling and risk assessment of dangerous chemicals and preparations is actually available,
- recognizing that this procedure uses fewer animals and causes less distress to them than the traditional LD50 test,
- considering that is has been adequately validated at an international level:

a) undertakes to propose the introduction of the fixed dose test procedure into Annex V of Directive 79/831/EEC,
b) undertakes to make the necessary modifications to Annexes VI and VII of this same Directive,
c) undertakes that once these modifications are officially adopted and incorporated into the legislation, to accept the data derived from the use of the fixed dose procedure.

The Commission hopes that all the OECD Member Countries which are not Members of the European Communities will undertake similar action, in order to incorporate the fixed dose procedure into their legislative schemes. It is clear however that according to the principle of the Mutual Acceptance of Data it will continue to accept data submitted according to the agreed OECD protocols as well.

5.3.4 Japanese Initiatives

In 1987, the Japanese Ministry of Health and Welfare drastically revised its stringent regulations for acute toxicity testing (Zbinden, 1988) so that:

- in rodents only an approximate LD50 is required;
- a limit dose of 2000 mg/kg is accepted for oral toxicity;
- a minimum of 2 non-rodent animals per dose/sex is permitted, with a minimum of two dose levels;
- a dose "sufficient to induce toxic signs" is sufficient in non-rodents; and
- both sexes need only be used in one species;

Japanese research initiatives toward developing and validating modified toxicity tests and alternatives include a 1985-87 study funded by the Japanese Ministry of Health and Welfare to verify the efficacy of a simplified fixed dose acute toxicity test for purposes of classification of poisonous substances (Zbinden, 1988).

5.35 Progress in the US (EPA and FDA)

In September, 1988, the US Environmental Protection Agency (EPA) announced a revised policy on acute toxicity testing. The agency is now reviewing public feedback received following that announcement. It will proceed with a revision of its testing guidelines this year.

The revised policy will continue to emphasize the tiered approach adopted in 1984. Thus, where there is no previous acute toxicity data, an initial review of structurally related compounds should be followed by a limit test where appropriate. Where further testing is deemed necessary, use of a well-validated abbreviated test scheme, such as one or more of the following methods, may obviate the need for further acute studies:

- approximate lethal dose methods (Kennedy et al., 1986)
- moving averages methods (Bruce, 1987)
- up and down method (Thakur and Fezio, 1981)
- Cumulant method (Gad and Weil, 1982)

In its revised policy directives, EPA is also urging industry to submit data obtained using alternative methods requiring fewer animals. In addition to these activities, it has been reported that the EPA plans to spend $1.5 million to validate certain structure-activity-relationships (SAR) procedures (IRRC, 1989).

The Acute Toxicity Guidelines in the Food and Drug Administration's (FDA) so-called Red Book (Toxicological Principles for Safety Assessment of Direct Food Additives and Colour Additives Used in Foods, US-FDA, 1982) are

currently under revision. In October 1988, the FDA published a statement in the Federal Register, 53, No. 196, p. 39650-51, on LD50 Test Policy. This statement reiterated that the "classical LD50 test is not an FDA requirement for determining safety" and that its use is not part of the agency's testing policy. The classical LD50 test was exemplified as a test that has become inappropriate or unnecessary. In fact, the FDA revoked its only regulatory requirement for that test in 1985, which was one calling for batch comparison of three antitumour antibodies.

In the ongoing revisions to the FDA's Red Book, the agency is looking to true signs of acute toxicity using few animals and avoiding lethality as much as possible. This holds true for both range finding purposes and for longer term and/or carcinogenesis studies. The guidelines will continue to recognize that acute toxicity information derived from animal tests may still be useful to industry in terms of product liability and to regulatory agencies for classification and in the management of crisis situations (food poisoning, toxins, etc.).

6.0 Skin and Eye Irriation

6.1 The Draize Tests

Skin and eye irritation tests usually involve a single acute exposure. They are designed so that corrosion (irreversibility of damage), degree of irritation, and pattern of recovery can be scored. Skin irritation should be, and usually is, determined prior to eye irritation testing since a substance corrosive to skin will be similarly toxic to the tissues of the eye and thus need not be tested further.

The eye irritation test of Draize et al. (1944) is still the basic whole animal test for eye irritation. This test has long been condemned on ethical grounds by animal welfare interests. In recent years, there have been intensive efforts within the scientific community to develop acceptable in vitro and other alternative procedures to replace this test. Several of these are now being evaluated, but none have yet been generally accepted (Frazier et al., 1987). In the interim, modifications that reduce the number of animals used, improve scoring, and reduce stress are gaining increased international acceptance.

6.2 An Industry Perspective - Europe

A recent monograph by an ECETOC Task Force (ECETOC, 1988) gives a thorough and generally balanced review of one of the most controversial toxicological tests in use today. This monograph refers to and endorses the OECD (1987) revised Test Guideline 405 as modified to reduce the numbers of animals used in the Draize test and to limit unnecessary suffering from the occurrence of severe reactions. The recommendations of the ECETOC task force are:

1. There is a need to harmonize existing guidelines on test methods with respect to the number of animals required. There is little justification for using more than three rabbits in the Draize test or the routine use of extra animals for irrigation studies.

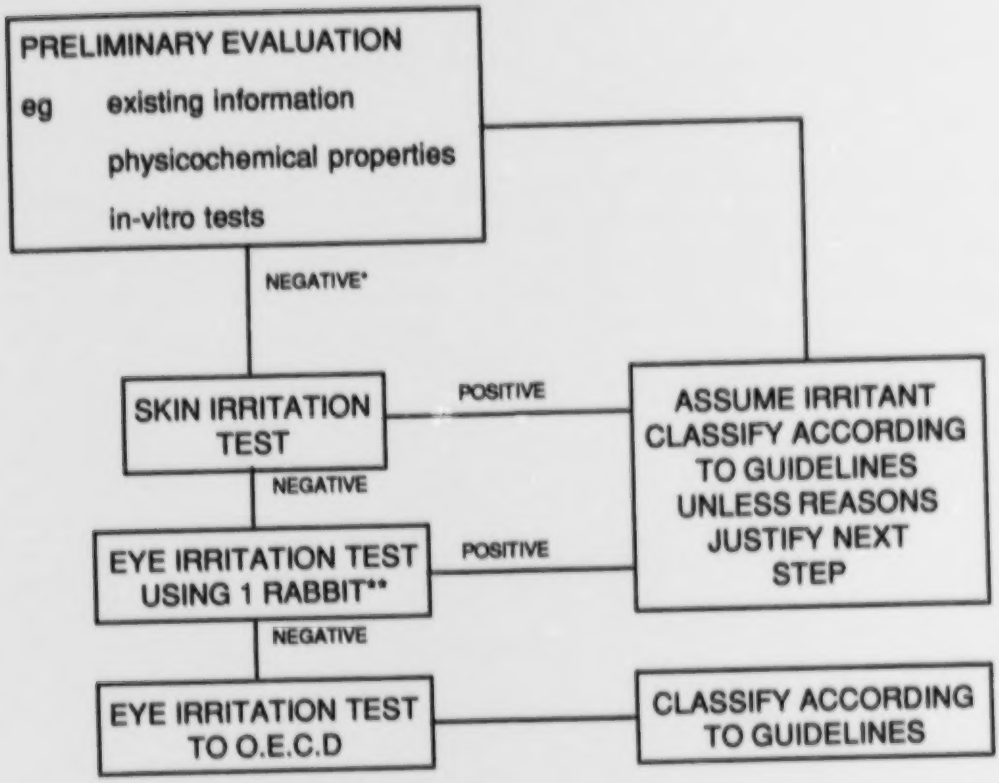
2. In order to optimize a humane approach to the determination of ocular hazard using a rabbit eye test it is recommended that a stepwise test strategy is always used (Figure 2). The low volume methods should be further validated.

3. The response of the animals when the material is first instilled into the eye should be considered in the overall classification of a chemical as an eye irritant. The rabbit eye test should not be used to distinguish between severe eye irritants and corrosive chemicals on the basis of days required for a lesion to recover.

4. The continued development and validation of in vitro tests should be encouraged so that their potential in pre-screening and as alternatives to the Draize test can be evaluated.

FIGURE II

AN EXAMPLE OF A STEPWISE STRATEGY FOR ASSESSING OCULAR IRRITATION



* The negative and positive criteria are defined by either (a) the experimentist or (b) international guidelines.

** At the in-vivo level the use of diluted material, a reduced volume or anaesthesia may be appropriate as part of the stepwise policy for assessment of ocular irritation.

Source: ECETOC Monograph #11 1988

5. There is a need to harmonize systems for classifying ocular hazard at an international level; this will require the collaboration of relevant regulatory bodies. At present the existence of a number of different classification schemes may result in different classifications of hazard from the same experimental data. It should be realized that any change in test methods will have an impact on the existing hazard classification schemes.

6. More information should be gathered about the effects of chemicals on the human eye. These data are necessary to assess fully the relevance of the present methods and classification systems for evaluating ocular hazard to humans.

Appendix 4, derived from several appendices in the ECETOC Monograph #11, provides an up-to-date, usefully annotated, list of most of the in vitro tests presently being intensively studied as possible replacements for the Draize test. The listing indicates the state of evaluation of each assay and comments on its correlation with the in vivo rabbit eye data.

6.3 Recent Advances - US

The American College of Toxicology devoted a special issue of the Journal of the American College of Toxicology entirely to the results of acute testing experiments on eye and skin irritation, photosensitization, and similar topics. This novel and potentially useful scheme provides a forum for material that is normally difficult to publish. This scheme was proposed in the belief that this information will tend to avoid duplication and provide a useful resource. Such information, though useful, has been considered to have a relatively low prestige value and thus is rarely published.

That this image is changing, and that progressively more information on the development and validation of alternatives and modified methods is becoming available, may be attributed both to animal welfare pressures and the establishment of several university-affiliated research centres.

6.3.1 Centres for the Study of Alternatives

The Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT), established in 1981 at Johns Hopkins University, and the Alternatives Laboratory at the Rockefeller University in New York City are two prominent American institutions that have contributed significantly to the advancement and legitimization of research and validation studies on alternative methodologies. Both have contributed extensively to in vitro studies on possible replacements to the Draize test. Moreover, both have enjoyed and continue to receive substantial financial support from individual industries and industrial associations. Supporters include the American Cosmetic, Toiletries and Fragrances Association (CTFA) and the Soap and Detergents Association (SDA), as well as many other commercial sources, animal welfare organizations, and public contributors.

The activities of CAAT encompass all aspects of alternatives to animal testing. CAAT also supports research in other institutions by awarding individual grants in aid of research relating to in vitro pharmacology and toxicology (see also p. 69). Most of CAAT's $1.8 million annual budget comes from consumer product industries. The Center operates its own in vitro toxicology research laboratory. It organizes and participates in numerous in vitro toxicology seminars. It has established an enviably high profile, both nationally and internationally, and serves as a model for university, industry, and government interaction.

6.3.2 The Role of Industry Associations

The cosmetic and soap and detergent industries have both played prominent roles in supporting research and encouraging the use of refinements to the eye irritancy test in response to public pressure. One example is the industry's promotion of the low volume technique which reduces the volume instilled in the rabbit eye tenfold. Although it clearly reduces the irritant effect and therefore pain and discomfort from various test substances, classification results will differ depending on what scoring criteria are used, Table VI (ECOTOC Monograph No. 11, 1988).

Industry in the US has also been an active participant with government and academic institutions in sponsoring seminar programs and workshops on alternatives.

The CFTA has a major new program under way for the evaluation of non-animal testing procedures used by several of its member companies as pre-screens. These studies are being carried out at the Battelle Memorial Institute (Columbus Division). It is claimed that several of the procedures are showing promise as replacements.

A joint government-industry workshop, with academic and public participation, held in the fall of 1988 on "Progress Toward Non-Animal Alternatives to the Draize Test," reached several important areas of consensus. These have been summarized by Dr. J. Frazier and co-workers (1987) of CAAT Johns Hopkins and are reproduced here as the concepts dealt with are also applicable to short-term testing in other problem areas, both here and in the US (Table VII).

TABLE VI

LOW VOLUME TEST
Influences of Volume on Classification

	100 ul Classified as "Irritant" by		100 ul Classified as "non-irritant" by		10 ul Classified as "irritant" by		10 ul Classified as "non-irritant by	
	EEC	FHSA	EEC	FHSA	EEC	FHSA	EEC	FHSA
chemicals	6	7	8	7	3	6	11	8
surfactants: anionic	2	5	9	6	1	2	10	9
cationic	2	3	2	1	0	0	4	4
amphoteric	1	1	3	3	0	1	4	3
mixtures	1	1	1	1	0	1	2	1
general purpose cleaners	2	13	19	8	0	11	21	10
fabric rise conditioners	3	6	3	0	0	2	6	4
fabric washing products	0	2	5	3	0	0	5	5
hair conditioners	1	2	2	1	0	0	3	3
	18	40	52	30	4	23	66	47

a.EEC: European Common Market Classification System
b. FHSA: Federal Health and Safety (USA) System.

At both test volumes more test materials are irritant by the FHSA criteria than are classified by EEC. FHSA criteria are thus more stringent.

A reduction in test volume from 100 ul to 10 ul resulted in:

FHSA - 17 of 40 substances being "declassified "to non-irritant."
EEC - 14 of 18 substances being "declassified "to non-irritant."

Source: ECETOC Monograph #11 1988

TABLE VII

SUMMARY JOINT GOVERNMENT-INDUSTRY WORKSHOP

The objective of the workshop was to provide a forum for interested parties to present data and discuss policy regarding the development and validation of alternatives to in vivo ocular irritation testing procedures. Several important areas of consensus were developed.

Overall, both government regulatory agencies and industry agreed that developing and validating test batteries for specific classifications of chemicals would lead to a more rapid acceptance and implementation of in vitro tests than would occur if universal validation of in vitro tests was required. Such an approach fits well with the current activities of the SDA and CFTA which are conducting validation programmes based on chemicals selected from either soaps and detergents or cosmetics.

- A second concept presented for consideration at the meeting was that a combined evaluation of the alkalinity of a chemical (which requires a chemical analysis) and an in vitro measure of cytotoxicity could potentially be used to screen chemicals, with limited animal tests performed to confirm the results when necessary. This tier testing strategy would significantly reduce animal exposure to harmful chemicals.

- Another important discussion centred on what data should be used to evaluate in vitro test methods in validation studies. The consensus was that the rabbit ocular irritation data (using the Draize scale) is the only quantitative database available. However, what limited human data exists (for example through the work at Proctor and Gamble) should be used to confirm the classification based on the Draize score. The rabbit database, although not optimal, can be used for the validation process.

- Comments by regulatory authorities indicated a perceived need for in vitro tests to provide data which can be interpreted in terms of mechanisms which produce the toxic response: such a mechanistic relationship is felt to be essential for a rational evaluation of human risks.

- Finally, the need to evaluate and standardize the various classification schemes used by different agencies for regulatory purposes was identified. More consistent criteria for classifying toxic properties of chemicals would simplify the design of in vitro test batteries.

The workshop was sponsored by the US Consumer Product Safety Commission (CPSC), the US Environmental Protection Agency (EPA), the US Food and Drug Administration (FDA), the Soap and Detergent Association (SDA), the Chemical Manufacturers Association (CMA), the Chemical Specialties Manufacturing Association (CSMA), and the Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association.

7.0 Acute Toxicity: Canadian Perspectives

7.1 Health Protection Branch

A recent directive from the Health Protection Branch (HPB) would seem unequivocally to support the position that HPB regulations will no longer require the use of the classical LD50 test. The text of the Memorandum dated November 15, 1989, from the Assistant Deputy Minister, Health Protection Branch, to chairman, Animal Care Committee, with copies to the Directors General of Drugs, Food, and Environmental Health, reads as follows:

> "The recommendation of the Branch Animal Care Committee that HPB adopt a policy of not requiring the classical LD50 test in any of its regulations is certainly acceptable to the Branch.
>
> "The Drugs Directorate's new Guidelines do not demand the classical test. Depending on the toxicity of the drug and the species used, acute toxicity testing is to consist either of determining the approximate LD50, sufficient to establish a dose-response curve, or minimum lethal dose or tolerance level. As well, the Guidelines indicate that parallel testing of male and female animals is no longer required and recommend that the most sensitive sex be used.
>
> "By copy of this memo to the appropriate Directors General, notice of the Branch's acceptance of this policy of not requiring the classical LD50 test in any of its regulations will be given."

7.2 Testing Requirements and Guidelines (LD50)

7.2.1 Drugs

The Drugs Directorate of the HPB has rarely made use of the classical LD50 test in its own laboratories. However, in 1987, the then Minister of Health, the Honourable Jake Epp, is recorded as stating that "its LD50 determination is an important step in the acute toxicity assessment of any new substance to which human beings may be exposed. We must therefore continue its use until such time as an alternative is found," (Anon., 1987). Regrettably, guideline recommendations for the use of this test for drug submission of protocols remained a part of the HPB guidelines to the pharmaceutical industry for the registration of new products through 1989. Furthermore, in many instances, data for both sexes were recommended. Thus, while it may have been literally correct to have stated that the Canadian government had never really required or demanded the use of the LD50 test (Rowsell, 1987), the effect of the position (until 1990) made it almost impossible, at least for the pharmaceutical manufacturers, not to conduct the LD50 and/or LC50 tests in order to obtain regulatory permission to market a new product or formulation.

The fact that the actual testing was rarely done on Canadian soil (our pharmaceuticals industry being essentially a branch plant one with its research and testing laboratories usually located elsewhere) would seem to be a rather shallow and spurious evasion of responsibility which, regrettably, has sometimes been used in the past.

The Drugs Directorate Guidelines - Toxicology Evaluation are still in the process of an ongoing review. The earlier requirements for a classical LD50 have been removed and replaced by modified test requirements to conform with the above-mentioned HPB directive. Thus, the Limit Test, Approximate LD50, use of one sex only and of only three dose levels, etc., are now being recommended where an acute measure of relative toxicity is considered necessary.

Development of the guidelines review and responsibility for drug submission protocol screening rests with the Bureau of Human Prescription Drugs. In the early stages of the current review process (late in 1987), an essentially unrevised form of the Acute Toxicity Guidelines was circulated within the Drugs Directorate for discussion and input. This "internal document" was brought unofficially to the attention of persons outside the HPB, both within Canada and overseas. This action generated extensive and unflattering criticism (Appendix 3).

The revision process was subsequently resumed, with some input obtained from the Executive Director of The Joseph F. Morgan Research Foundation (an Ottawa-based biomedical science-oriented organization committed to the advancement of in vitro testing and research procedures that reduce dependence on laboratory animals). Additional comments on the revised draft were sought from three national drug regulatory agencies and from an extensive internal review. The revised guidelines will be compatible, so far as LD50 requirements are concerned, with the most recent HPB directive (see HPB, p. 35). Furthermore, they will brought into line with current international regulatory thinking as regards other testing recommendations such as Draize eye irritancy procedures.

7.2.2 Food

The Food Directorate of the HPB has the major responsibility for determining health hazards associated with pesticides, food additives,and naturally occurring toxic compounds present in food. Since the human intake of many environmental contaminants is mainly from foods, the resulting regulatory mandate is extremely broad. The Directorate is responsible for the preparation of guidelines for the conduct of studies submitted in support of registration. These do not include any formal requirement for an LD50, and various estimates of acute toxicity are acceptable.

Testing is generally conducted on natural contaminants of food, such as fungal toxins and man-made environmental contaminants. Toxicological data on pesticides is generally required from the company petitioning for registration.

Monitoring for seafood toxins in shellfish in Canada is based on mouse testing. Mice are injected with concentrations of the shellfish extract as required. A test usually involves from four to six mice. As approximately 15,000 samples were tested in Canada in 1988, this testing procedure uses a considerable total number of mice. Monitoring the various Canadian shellfish areas for acceptable levels of such toxins as PSP (paralytic shellfish poison) was the responsibility of the Food Directorate until 1989. This routine monitoring is now undertaken by regional laboratories of the federal Department of Fisheries and Oceans, except in Quebec, where it is done by provincial government authorities. However, when sickness or fatality is reported, testing and investigation again becomes the responsibility of the Food Directorate scientists of the HPB.

Investigations and, to a limited extent, the use of replacements for this mouse bioassay are ongoing and involve the use of high pressure liquid chromatography (HPLC) and immunological methods. The limitation to their application lies in the fact that shellfish may carry one or more of numerous toxins, several of which have not yet been identified and classified. While the replacement methods identify individual specific toxins, the mouse bioassay remains the method of choice for eliciting the general response required for monitoring PSP and unknown toxins (Cembella and Todd, 1990).

7.2.3 Agricultural Chemicals; Environmental Protection

Late in 1988, the Minister of Agriculture announced his intention to strike a committee to undertake a thorough review of Agriculture Canada's regulations relating to the registration and use of agricultural chemicals (pesticides, herbicides, fertilizers, etc.). A chairperson was appointed in April 1989 to the Pesticide Registration Review. The Review will have an advisory board of representatives from farm and forestry groups, as well as from industry, government, environment, and consumer groups. It may be presumed that the committee's deliberations will address and make recommendations relating to acute and other toxicity testing procedures that bear on consumer and agricultural worker protection as well as on risk benefit assessment. They may also address harmonization of Canadian regulatory requirements with those of the US and our other trading partners.

Agricultural chemical submissions for marketing are reviewed for human health risks by the Environmental Health Directorate of the HPB. However, the final decision for responsibility, efficacy, and other regulatory considerations lies with Agriculture Canada. Agriculture's Health of Animals Branch is responsible for the safety and efficacy of veterinary biologicals. However, veterinary drugs come under the jurisdiction of the Drugs Directorate of HPB.

The new Canadian Environmental Protection Act (CEPA) calls for extensive, previously unrequired, testing for air and water pollution, industrial effluents, etc. As previously stated, the determination of potential human health risk will be the responsibility of the Environmental Health Directorate of HPB.

Administration of CEPA lies with Environment Canada, which has stated that OECD guidelines for the toxicological testing of chemicals will be adhered to, with the added proviso that other tests may be required/used at the discretion of the Minister. The Environmental Health Directorate in turn is committed to adherence to OECD guidelines for meeting its regulatory requirements.

The Canadian Wildlife Service is responsible for establishing and monitoring toxic safety standards for wildlife.

Neither Agriculture Canada nor Environment Canada is involved in any appreciable research or development activities relating to toxicological testing procedures, other than those specifically referred to in Chapter 11 (p. 66). Both agencies monitor developments in this regard, however, and are on record as being supportive of the development of protocols that may reduce or replace animals for testing purposes.

Scientists of the Environmental Health Directorate's Pesticides Division, who are responsible for protocol submission reviews on behalf of Agriculture Canada, are expected to devote from 10% to 25% of their time to research or other developmental or educational activities in relevant disciplines. Some of the projects involve in vitro toxicity test development and procedural modifications to improve test efficacy which may directly or indirectly reduce animal use and affect risk assessment.

This is undoubtedly a desirable provision that should be encouraged and made available to scientists in other regulatory agencies. An even greater degree of research involvement might be justifiable if regulatory agencies were to participate actively in method development and improvement and validation studies, as has occurred in several European countries.

7.3 Eye and Skin Irritancy

7.3.1 Regulations

Draize eye irritancy test requirements and guidelines are under scrutiny for the revised Drugs Directorate guidelines. To date, they have been only slightly modified in terms of the OECD recommended standards. The Draize test is rarely performed in the Directorate's own laboratories or anywhere else in Canada. However, guideline requirements for the test for drugs will necessitate its being performed somewhere, and thus makes the matter a Canadian responsibility.

The Draize test has never been required or recommended in the Food Directorate's guidelines, as eye irritancy bears little relevance to food-related toxicological risk.

In Canada, there is no requirement for premarket approval of cosmetics, soaps, etc., by the HPB. It is sufficient that data be available to the manufacturer showing the product is safe when used as directed. In the US, the FDA has regulations requiring that each ingredient used in a cosmetic and each finished cosmetic product be adequately substantiated for safety prior to marketing. Alternatively, the product must carry a conspicuous warning that its safety has not been determined.

7.3.2 Industry's Responsibility

Most member companies of the Canadian Cosmetic, Toiletries and Fragrances Association are subsidiaries of American or other foreign companies. The CCFTA participates in the activities outlined for its sister organization, the CFTA (p. 32). To date it has not, however, directly supported or promoted similar activities in Canada.

It should be pointed out that the chemicals industry as a whole, including individual cosmetics, soaps, and detergent manufacturers, have a responsibility to modify or replace the Draize test both for skin and eye irritancy. Here again, research support from industry to finance Canadian scientists would appear clearly to have been lost because of the subsidiary nature of so many of our industries. This is just now being addressed and rectified by the pharmaceuticals industry, through the Pharmaceutical Manufacturers Association of Canada's Health Research Foundation, as a required result of the 1988 revision to patent protection for that industry.

7.3.3 Cruelty-Free Cosmetics?

A recent international trend among cosmetic companies, including those in Canada, is to advertise that their products are "cruelty free." Such ads state that animals are not used in the development or safety testing of products. As has been pointed out by the UK Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (FRAME News 1989a and 1989b), a degree of deception (unintentional or otherwise) is implicit in such sales promotional slogans. Cruelty is not defined and the terms "cruelty free" and "not tested on animals" are relative ones which may simply refer to the finished product, not its ingredients, or to the manufacturers of finished products, not the supplier of ingredients, etc. The truth is, these labels refer to products using ingredients and formulations in which the manufacturers (and users) have confidence because they have already been shown safe by animal tests. The only real assurance of reduction and replacement of animals in cosmetics, as in all other forms of toxicological testing and product development, lies in the development and validation of modified traditional and alternative tests.

7.3.4 Research

A method for quantifying ocular toxicity changes by measuring laser beam transmission through abattoir-collected bovine eyes has been developed by Sivak and co-workers (1987) at an Ontario university. Such lenses may be maintained without change in organ culture for several months. The effect of test chemicals in the media on the transmission and refractive properties of the lens is measured to assess toxic effects. The test has been suggested as another possible replacement for the Draize test. It may also prove useful in measuring sub-acute and chronic effects of low-level repeat exposures to potential optical toxicants (opthalmic ointments, etc.) that are currently tested by a modified Draize test with repeated rabbit eye exposures (a scientifically questionable approach).

The Canadian animal welfare movement has provided considerable support over the past several years toward research and validation studies on methodologies to replace the Draize test. Most of this money has gone to the US, particularly in support of work on the chorioallantoic membrane (CAM) chick embryo assay developed by Dr. Joseph Leighton of the Pennsylvania Medical College, Pittsburgh, Pennsylvania. Support has come from such organizations as the Animal Welfare Foundation of Canada, the Canadian Federation of Humane Societies, the Canadian SPCA, and the Muriel Lowry Foundation.

8.0 Repeat Dose Testing

The previous chapters dealt with acute toxicity, particularly the perceived problems associated with the LD50 and Draize eye irritancy tests. These test methods and the long-term carcinogencity assays (Chapter 9) are not only high profile but, in many of their usages, clearly lend themselves to pre-screening, modification, and, in some instances, replacement.

Unfortunately,the immediate prospects for major reductions in animal use in longer-term repeat-dose testing appear more elusive. This may explain the relative lack of critical attention that modification and replacement of these procedures appear to have received.

Repetitive dose studies designed to mimic food consumption, rather than tests designed to simulate the acute exposure of workers, are the main concern of the HPB Food Directorate. This Directorate advocates protocol refinement to reduce the number of animals required. It further recommends that procedures be based on OECD and other internationally advocated guidelines. Studies of less than adequate design may also be reviewed in conjunction with other data in order to reduce the need for repeat studies. The Directorate has also indicated that any validated in vitro procedure will be considered for regulatory purposes. However, as no clear-cut criteria for acceptable validation have been indicated, the weight that would be attributed to such data is unclear.

8.1 Sub-Acute Tests

Because people and segments of the environment may be repeatedly exposed to foreign substances, it is often necessary to assess the effects of such exposure. This is done using longer-term (usually repeat-dose or continuous exposure) oral, topical, or inhalation studies.

These tests generally last up to four weeks. They use sufficient animals for statistical evaluation and a sub-lethal dosage, based on acute toxicity data. They provide data on the target organs and the no-adverse-effects level of value in risk assessment.

Both the EEC directive for the notification of new chemicals (67/548/EEC) and OECD recommend that substances with low acute toxicity profiles be initially subjected to a Limit Test at 1000 mg/kg body weight (or higher if humans are likely to be so exposed). A negative Limit Test obviates the need for a full sub-acute study and should bear on the decision as to the need for a sub-chronic study.

Omission of the sub-acute study may be considered if all of the following conditions are met (ECETOC, 1984):

- acute toxicity is low
- acute toxicity tests reveal no delayed effects
- bioavailability is low
- potential for bioaccumulation is low.

Careful consideration of test implementation based on the concept of "the necessary use of animals" would appear to be the most effective way of obtaining the required toxicological data with a minimum of animal use and costs.

8.2 Sub-Chronic Studies

Sub-chronic tests involve exposure, at an appropriate dose level, of up to 90 days in rodents. It may be necessary to determine the dose level by a preliminary range-finding trial using only a few animals.

The key to the need for, and extent of, these studies lies in the toxicity profile data from prior acute, sub-acute, mutagenicity, and cytotoxicity studies augmented by information on structure-activity relationships (SAR).

It seems probable that any reduction in the use of mammals will depend on the development of (a) suitable model systems using cold blooded and invertebrate animals and (b) specific mechanistic in vitro cytotoxicity procedures.

In the latter area, the use of short-term predictive tests for hepatotoxicity and neurotoxicity are the subject of considerable current research activity and are receiving progressively more consideration and use (OTA, 1986).

The immune system represents a target organ for both drugs and non-drug chemical insult. Traditional immunological methods have been used for evaluation studies. The repeat dose exposure interval for the development of an immune alternative depends on a variety of parameters, but is commonly tested on either a sub-acute or short (eight weeks) sub-chronic system. Low-level chronic exposure immunotoxic effects have rarely been examined (Dean et al., 1986a).

These authors point out that no simple test can conclusively demonstrate the stimulating or depressant effects of chemicals and drugs on the immune system. The use of a panel of in vivo and in vitro assays is recommended for screening. These should include in vivo rodent exposures for immunopathology and ex vivo/in vitro tests for cell mediated immunity and antibody modulated immunity.

No validated in vitro cell culture or lymphoid cell lines exist that can properly duplicate the complexities of the immune system. However, the use of multiple measurements on the lymphocytes of single, exposed individuals permits the use of many fewer animals. An added advantage of this approach is that several different assays can be performed on the cells of the same subject (Dean et al., 1986b).

8.3 Reproductive Toxicology Testing

These studies encompass tests for both fertility and teratogenic effects. European guidelines (OECD Guideline 414; EC Directive 67/548/EEC) recommend that where prior sub-acute or sub-chronic studies have indicated a low level of toxicity, a Limit Test at a single dose level of 1000 mg/kg should be undertaken. In the absence of adverse Limit Test effects, no further tests need be undertaken and the no-adverse-effects level can be taken as at least 1000 mg/kg body weight (ECETOC, 1984).

In addition to the presence or absence of significant changes to the reproductive organs noted in the sub-acute and sub-chronic tests, results from mutagenicity tests relevant to adverse effects on reproduction should be considered when determining the type and extent of the reproductive bioassay needed (fertility or teratology studies, one or two generation tests, etc.).

In vitro tests for the toxic effects of chemicals on both male and female fertility have been developed and show promise of being useful adjuncts to the traditional animal tests (Morrissey et al., 1988). However, these must be validated before achieving regulatory acceptance.

In teratology testing, OECD Guidelines specify a limit test of 1000 mg/kg body weight to pregnant females. If this dose fails to induce a teratogenic effect in the offspring, it should not be exceeded.

A number of alternative models for morphogenetic differentiation have been developed that may eventually prove useful as pre-screens in primary stage testing. These include organ cultures of limb buds and test systems using whole organisms, such as chick embryos and larval forms. None of these tests have yet been sufficiently validated to be acceptable from a regulatory viewpoint (Bass, 1986).

8.4 Canadian Regulatory Requirements

Studies using sub-lethal minimal effect dosages through periods up to 90 days are routinely required by the HPB Drugs Directorate in the preclinical testing of drugs for the risk assessment of toxic effects resulting from repeat dosage. In many instances, testing must also be undertaken for possible teratogenesis or adverse effects on fertility.

9.0 Chronic Toxicity and Carcinogenicity

9.1 Long Term Tests

9.1.1 Risk Assessment

It has been stated that the purpose of risk evaluation "is to identify possible areas of risk to human health, i.e., not to prove that a substance is safe but rather to indicate how potentially hazardous chemicals (and drugs) can be used for the purpose notified, with minimum risk" (ECETOC, 1984). It has also been stated that risk evaluation will enable "recommended precautions relating to the safe use of the substance" (Article 6.1 CE Directive 67/548/EEC).

It is in light of the above interpretations that most chronic (and to a considerable extent sub-chronic) toxicity tests are required and conducted. The results of short-term mutagenicity and cytotoxicity tests, SAR, and such other available aspects of the toxicological profile as bioavailability, metabolism, and target cell data are used to decide whether a chronic and/or carcinogenicity study is to be conducted.

Studies on the bioavailability, biotransformation, and the toxicokinetics of a substance will provide useful information on the need for a full chronic test. The expected level of human exposure and the demonstrable benefit from the product are also major factors that must be considered by regulatory authorities in risk assessment. These factors may lead to accepting that a substance has a carcinogenic or some other adverse chronic effect potential and should be handled (labelled, etc.) accordingly without further studies.

Most laboratories conducting product chronic toxicity and carcinogenicity tests use a two-tiered approach employing batteries of mutagenicity and, increasingly, cytotoxicity tests as a first-level screen. Second-level tests using animals will usually be carried out only if first-level results are equivocal or if further testing is necessary to satisfy safety regulation demands.

Properly implemented, the above preliminary considerations and testing strategies serve to ensure that animal use is restricted to the absolutely "necessary," as well as assuring maximum economy within the bounds of safety.

9.1.2 Rodent Bioassays

Bioassay for the detection of carcinogenicity involves two years or longer (lifetime) tests on groups of 50 rats and/or mice with comparable numbers of controls (both untreated and vehicle controls as well as, on occasion, a known positive or a known negative control group). In addition to the cost of approximately $1 million for a full cancer bioassay on a chemical or drug, there are a number of other limitations that concern predictive confidence in these tests:

- Large numbers are needed for statistical reasons. Many chemically induced tumours have very long latent periods, often with relatively low incidence rates. Thus, inadequate numbers of survivors or exposure time may lead to equivocal or even false negative results.

- The spontaneous incidence (background incidence) of cancer is high and variations in susceptibility may be considerable, making large numbers necessary.

- These problems have also tended to make the use of maximum tolerated doses of the test substance common, giving rise to test regimens which are difficult to equate with actual human risk.

- False negatives are known from the rodent tests (e.g., arsenic, benzene), even though these tests are generally oversensitive.

Despite these limitations, there is a consensus that, given our present state of knowledge, the rodent bioassay is still the best tool currently available for human risk assessment.

Combining a carcinogenesis bioassay and a chronic toxicity test using the same animals is a not infrequent practice that saves money and animals. There are, at present, very few other ways in which a long-term toxicity test or carcinogenicity test can be modified to reduce either the numbers involved or the pain and discomfort of the test animals. In the latter regard, it should be noted that in most carcinogenesis studies there will be relatively little pain until the terminal stages of tumour development. When a growth becomes observable or palpable, the animal should in most cases be destroyed and necropsied.

There can be little justification in most routine carcinogenesis bioassays for allowing animals bearing detectable tumours to live on and become moribund. An exception might be in the case of spontaneous tumours clearly unrelated to the substance under test (e.g., mammary tumours or lymphomas in certain rodent strains). The reason sometimes given for prolonging survival is the possibility of multiple tumours developing. However, such multiple tumours are rarely relevant to the purposes of the bioassay. The same may be said for the enhanced possibility of metastases which, though sometimes of experimental significance, will not usually affect the interpretation of a standard carcinogenesis bioassay.

It may be noted that in many instances a high proportion of the animals used in carcinogenesis tests will live out their natural lives without developing a tumour or any other ill effects attributable to the test treatment.

9.2 Short-Term Tests

Many short-term tests are available. Most of them are assays for mutagenesis reflected in end-points resulting from loss, damage, or repair to the DNA of a test organism or cell. Other aids to the short-term prediction of potential carcinogenicity include the assessment of structural activity relationships (SAR) and the use of computerized data.

Tumour formation is generally acknowledged to be a multi-step process involving both genetic and non-genetic events. In a number of types of cancer, the initial step (initiation) is known to involve a somatic mutation. Other cancer induction involves viral and cellular oncogenes which have been shown to involve definable genetic alterations. Thus, oncogenes may be activated by genetic changes to initiate carcinogenesis. The induction mechanisms involved in carcinogenesis by other cancer-inducing agents (mineral fibres, hormone-like substances, etc.) are not known.

9.2.1 Genotoxicity

Mutagenesis is suggestive of cancer initiation only, not necessarily of complete carcinogenesis.

Initiation is only the first of multiple steps in tumour formation. It is followed by promotion (possibly several steps) and, finally, progression toward clinical malignancy. These latter stages are not generally thought to involve genetic changes, although chromosomal modification may occur (Ramel, 1986).

Genotoxicity tests cannot be expected to pick up all chemicals that may act on the complex process of tumour development, only those that involve a direct genetic change (mostly initiators). The same can be said of rodent bioassays, which tend to pick out only chemicals that are complete carcinogens capable of both initiation and promotion.

Obviously, the sum of two imperfect detection systems should be greater than either one alone. It is in this light that short-term tests should presently be viewed, rather than as replacements. In these terms, the Salmonella assay, chromosome aberrations, DNA repair, and transformation assay -- whether applied singly or in combinations selected for specific purposes -- are proving a most useful adjunct to the standard rodent bioassay. They are particularly useful, and widely used by industry, for pre-screening and selecting candidate drugs and chemicals for further development with eventual subjection to a rodent bioassay. In this way, short-term tests have significantly reduced the use of animals and saved both money and time.

Most of the end-points in the common genotoxicity tests are relatively well understood. It seems probable that these assays will continue to be improved and refined in their capabilities to detect genotoxic agents which, in turn, will continue to facilitate the identification of potential human carcinogens (Lohman et al., 1987; Swierenga et al., 1990a).

Such tests are also useful in mapping metabolic pathways and other mechanistic studies which, in turn, add to the rationalization of risk assessment and the utility of the in vitro tests themselves. A further use of value in risk assessment is in testing human samples (excretory products and blood) for mutagenicity.

One of the problems inherent in culture assay conditions is that of inadequate biotransformation to allow for the activation of indirect mutagens. Use of liver microsomal fraction (S9) has been most helpful but does not replicate whole animal conditions. Recent advances have made use of liver perfusion and of co-culture techniques. Mutagenesis is also assayed in whole animal by the micronucleus or chromosomal aberration assays, usually using bone marrow cells from the mouse or other rodent. A very useful modification to the nuclear anomalies assay for carcinogen-induced colonic epithelial damage (Blakey et al., 1985) uses hair follicle cells from skin biopsies to demonstrate nuclear aberrations (Schop and Goldberg, 1988). Both tests were developed in Canada and the latter is presently undergoing further evaluation.

9.2.2 Structure Activity Relationships (SAR)

These are computer-generated in vitro aids to the assessment of the potential carcinogenicity of chemicals. They also seem to have a very definite but limited role to play as aids in the complex problem of accurately identifying carcinogens in our environment and estimating cancer risk. As an alternative to animal testing, SAR is being used in combination with other sources of information about test chemicals as an early pre-screen procedure before further in vitro and in vivo testing. It is particularly useful for discovery (candidate selection) of chemicals with lesser toxic probabilities or, conversely, for selecting chemicals most likely to have a particular effect in a given environment. SAR is also used to study toxic mechanisms by making computer-based structural modifications and observing the effects on the modelled toxic end-points. In carcinogenesis studies, the above applications may be of assistance in risk assessment (ECETOC, 1986).

The FDA referred to the use of SAR for pre-screening purposes in its 1982 Red Book revision. While the usefulness of these procedures is thought to be limited, its use as a broad-based early pre-screen continues to be advocated.

Some of the limitations of the SAR models include the sometimes limited data base on which a model may be based, a temptation to extrapolate beyond the capabilities of the model, and the "noise" inherent in the bioassays on which the models are based (Enselin, 1988).

9.2.3 Computerized Data Banks

The EPA/IARC data base for the display of short-term test activity profiles was developed to evaluate multiple test quantitative information on genetic toxicants. It should prove useful in comparative risk assessment, as it projects graphically the quantitative results of genetic and related tests as a "genetic activity profile." These profiles show the lowest effective and highest ineffective doses. Bioassay systems are organized according to classes of genetic activity and subdivided by the phylogenetic level of the test organism. The profiles are based on the mutagenicity of nearly 200 chemicals for which some data are available on human carcinogenicity. Used with information from animal tests and epidemiological studies (IARC Monograph Supp. 7, 1987), the profiles will facilitate assessment of human health risks from chemical exposure (Waters et al., 1988).

9.2.4 Non-Genotoxic Carcinogens

As has been noted several times in this report, there are numerous agents involved in the carcinogenic process that are not genotoxic (i.e., do not exert a demonstrable effect on information encoded in the DNA). Short-term tests have been based almost exclusively on mutagenesis, with estimates of risk derived from these by theoretical mathematical models.

Unfortunately, as already pointed out, the high predictive value implied by the fact that almost all chemicals that are mutagens can also be shown to be carcinogenic in some animal model (approximately 90%) does not hold true in the converse situation. Thus, in a number of instances non-mutagenic chemicals and other agents have proven to be carcinogenic in animals. Often this is because they exert their action through one of several different non-genotoxic mechanisms involving promotion, solid-state carcinogenesis, or one of several cytotoxic and hyperplastic mechanisms giving rise to liver, kidney, and bladder cancers.

It is only relatively recently that the frequency and importance of the role of such non-genotoxic agents in the carcinogenic process has been recognized. It has now become abundantly clear there is a pressing need for a set of reliable assays to define potential carcinogenicity for these several categories of non-genotoxic carcinogens (Butterworth, 1987). Such definition must of necessity involve in vitro tests that identify cytopathological and other end-points peculiar to the particular carcinogenic mechanism involved. This is an area of test methodology development attracting the increasing attention of research centres with a major commitment to in vitro toxicology in both the US and Europe.

An additional reason for this need is the difficulty often encountered in the unequivocal demonstration of cancer in rodents when very prolonged tumour latent periods are involved (e.g., fibres, many metal compounds, saccharin, foreign-body carcinogens).

9.3 Some Policy Positions and Views

9.3.1 Japan

Japan is an OECD signatory nation and the OECD guidelines have influenced Japanese regulatory requirements in toxicological testing. Thus, in the 1986 amendments to the Chemical Substances Law (Japan), two in vitro mutagenicity tests were adopted for screening purposes (a bacterial reverse mutation test and a chromosome aberration test using cultured mammalian cells). Additionally, guidelines for an in vivo micronucleus test using rodents, along with other longer-term guidelines, were introduced in 1987. These guidelines have been written mostly in accordance with the OECD Guidelines for Testing of Chemicals (First Addendum) Genetic Toxicology 471-474 (May 1983).

Studies are currently being funded by the same (Health and Welfare) Ministry on cytotoxicity tests and the development of novel toxicological methodologies.

9.3.2 US: FDA and EPA

The revised Red Book includes a chapter entitled "Short Term Tests for Genotoxicity." This chapter describes and discusses a variety of tests relevant to carcinogenicity and the induction of heritable genetic damage. The Food Directorate of the FDA is not ready to accept in vitro toxicity test results in lieu of animal studies for the estimation of heritable genetic risk in humans because it does not consider acceptable alternative methods to exist yet. Consequently, in vitro genotoxicity tests are used by the agency mainly to access the need for additional toxicity tests, to evaluate ambiguous animal carcinogenicity bioassays, and to investigate mechanistic explanations of carcinogenic activity.

In fact, the FDA Food Directorate has very active in-house in vitro and genetic toxicology laboratory research sections for the furthering of these objectives.

Both FDA and EPA are involved in the research activities of the National Toxicology Program (NTP). The NTP conducts an extensive in-house research program at their NIEHS laboratories in Research Triangle Park, North Carolina, on alternative, particularly genetic toxicology, methods development. An even greater proportion of their research program involves contracting out projects. For the fiscal year 1988, the NTP allocation for development and validation of in vitro methods was $17.7 million, or 22% of its total budget (IRRC, 1989).

FDA's commitment to the NTP is, in large part, through the research conducted at the National Center for Toxicological Research (NCTR).

9.3.3 Some NIEHS-NTP Views and Comments

The cellular and genetic toxicology branch of the NIEHS-NTP (National Toxicology Program) laboratories is concerned almost exclusively with genetic toxicology and short-term assays for cancer, fertility, and teratogenicity.

Discussions with researchers from the NIEHS-NTP in vitro toxicology laboratories elicited the following views on the status of, and trends in, genetic toxicology.

There has been a decade of enthusiasm and broad acceptance within the scientific community for short-term genotoxicity assays, based on their perceived cost and time savings. This has been replaced by a period of reassessment, of questioning how best to use these tests, of pressure for validation and queries as to which tests to use for what purpose.

Upwards of 200 in vitro and in vivo short-term tests have been published. Questions now being asked are:

- How do these tests rate?
- How should they be used?
- Which is the better approach - tier system or battery testing?

Performance of these tests must be based on test results, not theory, and the results need critical analysis. It is not enough to identify a group of positive mouse carcinogens as also being positive in a given in vitro test. The acid test is: can the assay discriminate? Even if it can, this still leaves the problem of its relevance to humans.

There are insufficient proven human chemical carcinogens, possibly 26 (IARC, 1987), and these do not represent an adequate spectrum of chemical classes. There is an equal or greater shortage of proven noncarcinogens.

The trend is considered to be away from using the large battery approach. A single Salmonella test and an in vivo micronucleus or chromosome aberration test was suggested to be adequate. Negative results in many of the test systems in use cannot be considered as predictive (pp. 15-16).

A major current problem is with short-term assays for nongenotoxic carcinogens (fibres, metals, hormones). Genetic toxicology procedures were developed for organic chemicals that interact at the molecular level with DNA and therefore are not suitable. Devising short-term tests for nongenotoxic carcinogens is inhibited by our lack of understanding of the carcinogenic mechanisms involved.

If genotoxicology tests are to be developed for the nongenotoxic carcinogens, they should be compared with nongenotoxic organic chemicals that are known cancer risks to humans. The trouble is that few, if any, are known for sure.

Other in vitro toxicological approaches would seem more appropriate. Attempts should be made to design assays to fit chemical classes.

Rodent carcinogens, as the only measurement standards for validation, are unsatisfactory.

Based on the current data-set, the Salmonella assay is considered the only one that is reasonably predictive (a view by no means universally held even within the agency). In vivo micronucleus and chromosome aberration tests were also considered to have fair predictive potential.

To develop and validate a new assay, one should be able to demonstrate results on equal numbers of carcinogens and non-carcinogens. Validation should be a two-step process of confirmatory tests and discriminatory tests. Claims that a test is confirmatory must also be able to show it to be discriminatory. A major problem in this regard is the lack of good, reliable non-carcinogens.

Salmonella tests are the least prone (sensitive) to artifact (pH, etc.) and it was felt that a positive Salmonella test was a good predictor, while a negative one could not be relied upon (except where the chemical structure was known). The same judgements probably hold for the bone marrow and other in vivo short-term genotoxicity tests. However, the consensus feeling is seemingly favourable to in vivo short-term results at this time.

10.0 European Directions

10.1 In Vitro Toxicology Research

10.1.1 Concepts

Over the past decade, there has been a rapid expansion of interest among academic and industrial toxicologists throughout Western Europe in all aspects of the discipline of in vitro toxicology and in the development of procedures that use fewer animals for testing. Of particular note, in contrast to the apparent situation in Canada, is the active involvement of regulatory scientists in development and validation studies on these methodologies. The health, environment, agriculture, and science and technology ministries of several West European governments actively participate in or financially assist research on alternatives and validation studies in collaboration with industry and university scientists.

In North America, in vitro toxicology, exclusive of mutagenesis studies, is practised in-house by industry to a varying extent for product development. Active research in this field has, however, been restricted to relatively few individuals. Canadian research programs are essentially lacking. Research efforts in both countries have concentrated on the narrower, more specialized subdiscipline of "genotoxicity."

10.1.2 Recent Progress

In Europe, "in vitro toxicology," or "cellular pharmacotoxicolgy," is a rapidly growing new research area with government and industry support. Scientific societies specifically oriented toward this subdiscipline exist in many European countries including France, U.K., Belgium, Italy, and Scandinavia. These societies, in co-operation with government and industry, sponsor research programs, workshops, and training courses. Other activities have included organizing inter-country validation studies, the support of data banks, and the launching of new journals. Cellular toxicology research in Europe appears to be considerably further advanced than in North America.

The growing impact of this research area seems attributable to several factors: (1) recent advances in cell culture and biochemical (inciuding molecular) technologies; (2) the practical advantages of alternatives, particularly in vitro systems for metabolism, toxicity, and mechanistic studies, in developing new products, especially drugs (see below); (3) the perception that such research contributes toward the development and implementation of alternatives to animals in toxicity testing; and (4) a response to the pressures being exerted politically for the harmonization of European national community regulations scheduled for 1992, as well as those from the strong animal welfare lobby in several Western European countries.

These factors have led to the active encouragement of research for alternatives, along with an increased availability of government funding in a number of European countries. For example, the May 1989 issue of the West German Bundesanzeiger (Gazette) from the Federal Ministry of Science and Technology announced the availability of up to DM 21 million for in vitro methods R&D and the refinement and validation of procedures that will reduce animal use and stress. Projects for funding are required to be joint endeavours between publicly funded institutions and industry and will come under the aegis of the Ministry's program of Applied Biology and Biotechnology. Initially, four specific research areas have been identified: (1) elucidation of pharmacodynamics and efficacy, especially with regard to the central nervous system; (2) development of models of infection for the testing of new treatments (therapeutic agents); (3) oncology research to develop new cytostatic agents and treatment regimens and to study the mechanisms of metastasis; and (4) testing procedures for systemic and local effects to toxicants (FDR Bundesanzeiger, 27 May 1989, No. 96, p. 2583).

European research programs in cell toxicology seem likely to have considerable influence in the formulation of future toxicity testing guidelines by European regulatory agencies.

10.2 European Research Institutes*

The programs at three European research units active in in vitro testing, method development, and validation studies are described in support of the above statement on their relatively advanced level of sophistication. These laboratories are located in France, Switzerland, and West Germany. Their programs will be reviewed in some detail. The French and Swiss institutes were visited in December, 1988, while the West German unit was visited later.

10.2.1 France

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM),
Unit 49 - Unité de Recherches Hépatologiques
35033 Rennes Cédex - France

Research Director: Dr. André Guillouzo

INSERM's Unit 49 is concerned with developing in vitro methods for drug metabolism and toxicity studies based on in vivo findings. It has approximately 40 rapid, automated, biochemical function and toxicity tests and is in the process of developing a three-day routine screen using approximately 10 of these tests.

*The author wishes to acknowledge the valued assistance of Dr. S. Swierenga on the visits to two of the three European research institutes (France and Switzerland). Dr. Swierenga, a research scientist with the Bureau of Drug Research, was at that time a visiting scientist at the International Agency for Research on Cancer (IARC) in Lyons, France.

Mechanistic studies to determine types of drug-induced damage expected are also done.

Some of the screening tests in use are:

- LDH leakage (intra and extracellular, membrane damage assays)
- Albumin secretion (function test)
- Morphological criteria (standardized scoring criteria)
- GST (glutathione S transferase) analysis
- Oil Red 0 (lipid induction)
- Neutral Red (membrane damage)
- Tetrazolium Blue (mitochondrial damage)
- P450 isozyme induction
- Amino acid uptake (protein synthesis)
- Automated fluorescence techniques (for several assays)

The unit has routinely performed testing under contract to pharmaceutical companies for product development. Work in this areas has been so extensive that in 1987 a separate firm (Biopredec) was created solely to undertake contract work on pharmacological and toxicological effects of new compounds.

The success of the INSERM research program can be attributed to its focus on problems relevant to human risk assessment. Among the problems that have been addressed are:

- Methods for the long-term culture and functional drug metabolism of human hepatocytes, and for using cryopreserved human hepatocytes.

- The problem of human genetic polymorphism in drug metabolism (and therefore susceptibility to risk). Batches of hepatocytes are classified for "normalcy" by evaluating their ability to metabolize four specific drugs and in comparison with standard human phenotypes. For example, identifying the animal test species most relevant (for human risk) for a particular drug by comparing metabolism in hepatocytes from different species, e.g., rat, dog, rabbit, monkey, and human.

Numerous species differences in drug metabolism have been reported by this group as a result of these studies.

Sample areas of research activities include:

- Comparison of presence and inductibility of drug metabolism enzymes in cultured hepatocytes versus intact livers.

- Metabolism of specific drugs studied by HPLC and mass spectrometry analysis.

- Co-culture of hepatocytes from various species with undifferentiated rat liver epithelial cells has made it possible to conduct experiments of longer duration. Chronic toxicity studies have been devised based on daily addition of a given drug for two to three weeks.

- A project is under way to study oncogene expression during cell transformation in vivo and in vitro, as well as the induction of specific oncogenes during liver regeneration, cell isolation, and cell culture. These studies provide important mechanistic information for development of in vitro carcinogen assays.

The research director is coordinating an interlaboratory INSERM-sponsored cytotoxicity-screen validation study. This consists of 30 coded compounds in six laboratories (three drug company labs, three government labs). The screen uses rat hepatocytes and five different concentrations of each test compound. Tests being validated include morphology, extra and intracellular LDH, neutral red, commassie blue, and tetrazolium blue.

The unit has also taken an active part in promoting in vitro alternatives, including public relations, workshops, and collaboration with other international groups. The director predicted that in vitro hepatotoxicity tests would become part of the European toxicity testing guidelines within four years. He is one of the founding members and a director of the European Research Group for Alternatives in Toxicity Testing (ERGATT) and is actively involved in the setting up and promotion of the ERGATT/FRAME in vitro toxicology data bank - INVITTOX, which recently released its first list of cleared protocols (Ungar et al, 1990).

10.2.2 Switzerland

Institute of Toxicology
Department of Biology, Swiss Federal
Institute of Technology and University of Zurich
CH8702 Schwerzenbach, Switzerland

Director: Dr. Gerhard Zbinden

Dr. Zbinden is one of the most prominent international spokespersons for the critical evaluation and improvement of toxicological methods, including the consideration of alternatives which use fewer or no animals. His research unit consists of about 40 staff members, most of whom use in vitro techniques. Researchers are involved in the development of in vitro toxicity tests and rapid non-lethal animal tests.

Their primary aim is not to replace animals per se, but to develop better, more biochemically sound models. Dr. Zbinden cited the batch control of insulin as an example for this. Formerly, batches were tested by a convulsion test using about 600 mice per sample. New tests using HPLC analysis require no animals (Trethewey et al., 1986). This test is markedly more sensitive, to the point that human and animal forms of insulin can be distinguished.

Animal test refinements under development at the institute include acute toxicity testing with non-lethal doses (e.g., by means of in-cage monitoring of motor activity) and nephrotoxicity screening based on urinalysis.

Research project areas include:

- Cytotoxicity tests (potential Draize alternatives). A rapid, automated test using fluorescent dyes and flow cytometry analysis has been developed, which measures shifts in dye retention (fluorescein) and dye exclusion (ethidium bromide) after chemical treatment. The test uses rat thymocytes, is more rapid and sensitive than standard dye exclusion assays, and is quantifiable.

- Cell function test for use in product development studies.

- Neurotoxicity tests. Reaggregate cultures of chick nerve tissues using morphological, pH, and microtubule-associated protein changes as end-points.

- Hepatotoxicity. Methods have been developed for rapid automated analysis of hepatotoxicity after chemical treatment in vitro. Using flow cytometry, DNA and protein contents can be rapidly and accurately measured. Co-culture systems (with rat liver epithelial cells) are used for maintaining metabolizing enzyme activity in vitro for prolonged periods.

- Cellular markers for carcinogenic events. Rapid assays to detect early cellular markers for neoplastic events are done by flow cytometry. Rat fibroblasts have been used to determine chemically induced changes in cell cycle kinetics (shift from G0 to G1 phase of the cell cycle) and analyses of nuclear/cytoplasmic ratio. The test is suitable for detecting the cell cycle promoting activity of chemicals in non-proliferating cells in vivo and in vitro. Phenobarbital, for example, was active in this assay. This test has the ability to rapidly detect chromosome and spindle damaging agents.

- Granuloma Pouch Assay. An in vivo/in vitro assay has been developed using the granuloma pouch technique, originally developed at the Université de Montréal. The pouch is induced by injecting air into the subcutaneous connective tissue of rats (Selye, 1952). Test chemicals are injected either into the pouch or systemically using the mesenchyme-derived lining cells as the target. Various mutagenic events, including mutations induced in vivo, can be measured within the same target cell population. The end-points used include in vitro mutation assay (thioguanine resistance) and growth in soft agar. This is a relatively rapid and versatile bioassay that is predictive of potential carcinogenicity and uses few animals (Maier, 1984).

Use of the granuloma pouch for the detection of the tumour-specific calcium binding protein oncomodulin early after carcinogen treatment is still in the developmental stages. This would be a particularly useful in vitro marker, as it is specific for tumorigenicity, and not a general property accompanying growth induction, as is presently the case with many of the molecular marker oncogenes.

Professor Zbinden has pointed out that current basic biomedical research is largely concerned with biological mechanisms at the cellular and molecular levels. This lends itself in many instances to in vitro methods rather than whole animal studies. Furthermore, "prestige from scientific success has clearly shifted to technical exploits at the molecular level much to the benefit of the laboratory animal." The trend is similar in the manufacture and quality control of biologics, thanks to rapid advances in cell culture, recombinant DNA methodologies, cost savings, and regulatory encouragement.

Progress away from animal testing has been much slower in the product development areas due to tradition, dependence on historical data, poor financial support, and little prestige in research on alternative methodologies (Zbinden, 1988).

10.2.3 West Germany

The Chemicals Bureau
Max Von Pettenkofer Institut
des Bundesgesundheitsamtes (BGA)
West German Federal Health Office
West Berlin

Director: Dr. D. Kayser

This Institute is part of the research arm of the West German Federal Republic's Health Department (BGA). Dr. Kayser's unit is also responsible for chemical regulatory guidelines. Food additives and pesticides have separate registration, as do drugs and biologics.

The Chemicals Bureau maintains a permanent working group on updating toxicological methods. Currently, it is undertaking a validation study on a modified LD50 somewhat similar to the Fixed Dose Test under validation elsewhere in Europe by OECD with the UK as lead nation. The BGA study is relatively small, involving five industrial laboratories and BGA itself. A progress report on this study was presented at the OECD seminar in Brussels in September 1989 (p. 25). Dr. Kayser predicts acceptance within the European community early in 1990 of a new acute toxicity testing method for chemicals. A German proposal to CEC would require use of an approximate LD50 in pharmaceuticals testing.

West German regulations for chemical testing already require that non-animal methods must be used, if they are available and acceptable. A larger validation study involving a ring test with 15 laboratories (10 from industry and five from universities) is under way for evaluating the CAM chick embyro assay, using an eight-day incubation, and the neutral red/kenacid blue cytotoxicity assays as a Draize test replacement. Forty-four test substances are to be used over a two-and-one-half-year period at a cost of over three million DM (approximately $2 million Canadian).

The Institute itself is relatively small and its research program is essentially restricted to methodology studies related to the validation programs. One such related study has resulted in proposals for new test guidelines for skin sensitization (Schlede et al., 1989).

Dr. Spielmann, whose research interest is in reproductive toxicology, is responsible for coordinating the Draize validation program. He is also working with embryonic stem cells in culture (co-cultured with fibroblasts) as a model for testing teratogens. Recently, Dr. Spielmann was appointed Director of a new West German federal central agency, Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Tierversuchen, (Central Registry and Evaluation of Animal Experiments). Located in Berlin, this agency will accumulate and disseminate information on advances in toxicological procedures.

Animal welfare pressure, which in turn has led to political pressure, was said to be very strong in West Germany. No more animal testing will be allowed on cosmetics, soaps, or detergents after 1989. Consequently, West German companies such as Henkel have spent and are committed to spending a great amount of money and effort on in vitro test development, such as Draize alternatives and simulation studies.

10.2.4 Regulatory Collaboration

Within the European community both the national and international regulatory authorities (OECD, CEC, etc.) have played active roles in the development and acceptance of alternative methods for the regulation of drugs and other chemical substances.

International harmonization of such acceptance seems well in hand within the European community, but progress beyond the EEC is more problematical and uncertain.

The following stages in bringing an "alternative" up for international regulatory acceptance have been outlined by the chairman of the European Economic Commission's Committee for Proprietary Medicinal Products, who is also the Director of the Institute for Drugs of the Bundesgeshundheitsamt (BGA) of the Federal Republic of Germany (FRG):

1) Proposals from research scientists pass through peer review. (If there are no scientific proposals, animal protection groups have taken over this role.)

2) Proposal evaluation may lead to funding on a national basis. (In the FRG, this often involves regulatory scientists and agencies.)

3) Following scientific study of the rationale and the usefulness of the method, decisions on its regulatory applicability will often require "collaborative studies" (financed, organized, and performed by or through regulatory agencies) which may lead to national acceptance.

4) Validation and national acceptance having been achieved, harmonized test requirements necessitate reaching an international agreement on the use of the "alternative" method (Bass, 1988).

Clearly, there can be no "quick fix" to validation and acceptance, even with the active participation and good will of all parties concerned.

Significant advances can and are being made, however, where there is appreciable regulatory agency participation. This is exemplified by the scientific departments of the National Institute for Biological Standards of the UK. This institute gives a high priority to work directed at the development of non-animal testing of biological products. Its activities include not only the development of novel, non-animal tests, but international collaboration through WHO, EEC, other bodies, and industry to establish the methods as being acceptable to routine testing of commercial products.

Substantial progress has been achieved recently by this group in investigations relating to:

- in vitro alternatives to quality control of biological products;
- detection of pyrogen by lymphokine release as an alternative to the rabbit pyrogen test;
- in vitro assay of rabies glycoprotein as an alternative to the NIH test using live mice; and
- a test for neurovirulence of poliovirus vaccines based on identification of the mutation involved in alteration of the virus.

These studies by Dr. G.C. Schild and co-workers received special mention in the 1988 European Pharmaceutical Industry Award as an important contribution to the development of new "alternative" methods (Roberfroid, 1988).

10.3 Other European Initiatives

10.3.1 Industrial Association Activities

Industrial organizations, such as the European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre (ECETOC) and the European Federation of Pharmaceutical Industries Association (EFPIA), are clearly supportive of the development and utilization of effective testing methods that reduce or replace animals (Cano, 1988). The activities of these organizations reflect the policies and interests of their member companies in research on product development and safety. In the past few years, this has focused on the necessity for action in harmonizing regulatory test requirements and concomitantly on alternative methods research. These organizations cooperate actively in a scientific context with CEC, OECD, and other government and intergovernmental agencies.

Among the more visible ECETOC activities is their monograph series produced by task forces of experts drawn from the extensive European industry scientific community available to the secretariat through its member companies. They also use appropriate consultants. Several of these monographs have provided useful reference materials for this report and its appendices.

Among the more notable recent activities of the EFPIA was the institution in 1986 of a biannual 25,000 S.Fr. award for research conducted in Europe. The same subject was chosen for the first two awards, namely Alternative Methods to Animal Experimentation. This repeat choice was stated by the Director General of EFPIA to be partly an expression of industry's own wishes, partly a complement to work undertaken by the Council of Europe and the EEC in this field, and partly a response to parliamentary and

public concerns. Whatever the reasons, the repetition is surely a testament to the acute interest of European industrial and regulatory scientists in promoting in vitro methodological research.

The Director General of the EEC Environment, Consumer Protection and Nuclear Safety Directorate (DG XI) has outlined the challenge currently facing regulatory bodies in Europe as being to "continue to fund research into alternative methods and also where appropriate, provide a mechanism for the evaluation and validation of such methods" (Brinkhorst, 1988).

This is a challenge and a responsibility that does not seem to have been recognized by Canada's regulatory authorities.

10.3.2 Data Banks

Some organizations, such as the UK-based Fund for the Replacement of Animals in Experimentation (FRAME) and its continental counterpart the European Research Group for Alternatives in Toxicology Testing (ERGAT), are professionally oriented with very constructive, well-established programs.

Among such organizations, FRAME is internationally known and respected. Founded in the mid-1960s, FRAME publishes the scientific journal ATLA and sponsors and co-sponsors national and international meetings. FRAME's in vitro pharmacology data bank has proven a useful advance source of information to scientists.

Recently, a comparable multinational organization appeared in continental Europe. The European Research Group for Alternatives in Toxicology Testing (ERGATT) works closely with FRAME and has established a further data bank, this time for in vitro techniques in toxicology (INVITTOX). Either bank may be accessed by writing to FRAME, Eastgate House, 34 Stoney Street, Nottingham, UK NG1 1NB.

In 1988, the French animal welfare organization "Assistance aux Animaux" established a reference centre on alternative methods. This centre, CIDOMS (Centre d'Information et de Documentation sur les Methodes Substitutives), will provide information on international legislation and technical matters. Eventually, CIDOMS will also provide literature searches.

A West German animal welfare organization, the Academy for Animal Protection, also appears to have a constructive program underway. This organization maintains its own tissue culture laboratory for research on in vitro toxicology in collaboration with two university departments. In 1986, the Academy established an in vitro alternatives data bank, which now lists over 3,600 entries on animal testing procedures and experiments and their potential alternatives. The data base, available in three volumes, may be obtained through the Akademie fur Tierschutz, Spechtstr. 1, D801 Neubiberg, West Germany.

10.3.3 Evaluation Studies and Research Support

In addition to its previously mentioned involvement in the setting up of two data banks and in journal publication, FRAME is at present actively engaged in an ongoing effort to have validated alternative toxicological procedures applied to the rationalization of test guidelines. To further this aim, the FRAME Committee on Toxicology is working on a major report, which is planned for release at a FRAME-sponsored international conference planned for London in 1990.

It is interesting to note that the recommendations from the first report of the FRAME Committee on Toxicology were incorporated, almost in toto, into the chapter "Alternatives to Animal Use in Testing" of the OTA Report (1986) as a listing of current trends (Balls, 1987).

In Sweden, the Nordiska Samfundets Stiftlse For Vetenskaplig Forskning Utan Djurforssk (Fund for Scientific Research without Animal Experiments) seeks research proposals from Scandinavian biomedical scientists on in vitro toxicology projects for funding. Their program supports 10-15 scientific projects with approximately one million SEK (approximately $200,000 Canadian). Fourteen of 45 grant applications were supported in 1988. The fund is also involved in an acute toxicology validation project.

In 1988, Sweden enacted new animal protection laws, one of the functions of which is control of animal experimentation. This involves an Ethics Committee's approval and will no doubt add increased urgency to the search for, and validation of, methods minimizing animal use and pain in that country.

In the United Kingdom, moderate animal welfare organizations such as the RSPCA work closely with FRAME, leaving most of the activities concerning alternatives to that organization. The RSPCA concentrates on promoting the refinement of existing techniques and has recently commenced workshops to examine and recommend improved methodologies for such procedures. These will be published twice yearly in the journal Laboratory Animals, a further example of the advantage of cooperation over confrontation.

There are at least four research trust funds in the UK that are available (and, in some cases, directed entirely) to the financial support of largely university-based research, development and validation projects that will reduce, refine or replace the use of animals in research and testing. These research trusts are:

- Dr. Hadwen Trust For Humane Research, 46 Kings Road, Hitchin, Herts.
- Humane Research Trust, 62 Bramhall Lane South, Bramhall, Cheshire.
- Lawson Tait Medical & Scientific Research Trust, 51 Harley Street, London W1.
- Lord Dowding Fund for Humane Research, 51 Harley Street, London W1N 1DD.

11.0 Activities in Canada

11.1 Health Protection Branch Laboratories

11.1.1 The Bureau of Biologics (BoB)

Laboratories in this Bureau are among the relatively few engaged in regular in-house toxicological testing. The Bureau undertakes batch testing on vaccines and other biologicals destined for domestic and overseas distribution. Canadian commercial production of polio, rabies, yellow fever, and other vaccines is quite extensive.

Injectables must be assayed for pyrogens. Pyrogen testing has classically measured temperature changes in rabbits following injection with the test substance. An in vitro alternative utilizes amoebocytes from the horseshoe crab (Limulus), which are lysed in the presence of pyrogens (LAL Test).

BoB uses the LAL test routinely, except in the case of interferons. Rabbit screening is more sensitive to pyrogens present in interferons, sometimes giving a positive reaction when the LAL test is negative. Parallel tests are being run by the Bureau on interferons using the two methods. It is thought that the rabbit is, in this instance, hypersensitive, picking up "harmless" innate pyrogenic factors (possibly derived from such immunogenic substances as Interlukin II). It is hoped that these data will show the LAL to be as satisfactory a safety assessment method for interferon as it is for other biological injectables.

Scientists in the Viral Products Division are pursuing projects aimed at: (1) adapting an ELISA Test as a replacement for the rat potency test on unactivated polio (Salk) vaccine; and (2) using a human cell line (HEP2) instead of primary cultures of monkey kidney for testing isolates from field cases of polio to determine whether they are of vaccine or wild virus origin. A monkey must be killed each time to provide primary cultures.

Neurovirulence tests are performed on maccaca monkeys for oral polio vaccines. Since 1980, fewer primates have been used for this procedure than previously (a total of 42 as opposed to the 135 required by the old methods for test and controls against the three polio virus strains involved). Acceptance of this modified test methodology followed joint studies by the UK, US, and Canada (Contreras, 1987). While research is continuing, there seems little likelihood of an acceptable alternative or further reduction in numbers within the next five years. It is not unreasonable to expect that the rapid advance in our understanding of the viral genomes involved may allow the identification of biochemical/genetic end-points demonstrable by in vitro testing in the future. In Canada, unfortunately, there is often great difficulty in obtaining funding for such applied R&D type research through regular "grants in aid of research" channels (see p. 69).

Of other vaccines presently tested on animals, rabies is subject to the NIH intracerebral mouse challenge test, for which at present there is said to be little sign of an effective substitute. Yellow Fever vaccine potency has also to date been tested in mice. However, a joint project between BoB and Connaught Laboratories has recently validated a tissue culture (plaque assay) which has now been formalized as the accepted Canadian potency test for Yellow Fever vaccine for regulatory purposes. A similar in vitro replacement project for the Adenovirus safety test is being initiated by the same BoB research group, but without industry collaboration.

The continuing search (screening) for extraneous agents that must be maintained on all biologics uses both animal and tissue culture test methods. Comparative data from these tests are under continuous review by the Bureau (and similar agencies in other countries) with a view to the adoption of culture methods if they prove to be satisfactory predictors of the masses of mostly negative data compiled by these sorts of routine quality control tests.

The above description of the Bureau's activities are encouraging from the viewpoints of efficiency, economy, and lab animal conservation. However, there is a negative side to this report, namely retroviruses. Recent events, particularly the rise and spread of the AIDS virus, have made the thorough screening for slow retroviruses essential for all substrates and biological agents used for injectables. This translates into "new," very extensive parallel animal and in vitro testing for the presence or absence of the virus and for comparative methods efficiency studies.

11.1.2 The Bureau of Drug Research

The Bureau of Drug Research has several sections that utilize in vitro procedures for testing and research. The genetic toxicology section of the Bureau is primarily concerned with the application of in vitro toxicology tests to problems of concern to the regulatory arm of the Drugs Directorate. The section has participated actively in the affairs of the US Pharmacopea (USP). It is presently investigating the feasibility of adapting the "Microtox" assay (based on the reactivity of bacteria to toxic substances) to drug safety evaluations (Matula et al., 1990).

The section is also involved in the standardization of mold allergens which provides the basic scientific knowledge and reference standards of allergen extracts. These will eventually permit regulations to be drawn up governing commercial preparations being sold for allergy desensitization therapy. Various in vitro methods have been developed to adequately measure the allergenic potency of these extracts (Vijay et al., 1989).

Currently, research efforts are being directed toward production of monoclonal antibodies and gene cloning procedures that should lead to a better understanding of the structure of these allergens.

Over the past several decades, a second laboratory within this section has been largely devoted to mammalian cell in vitro toxicology (both genetic and cellular). This laboratory's research program has also been active in developing methods for, and elucidating mechanisms involved in, in vitro tests for tumour promoters and

non-genotoxic carcinogens (for review see Swierenga 1985). Particular emphasis has been on the role of cytotoxicity in the transformation process (Swierenga et al., 1990b,c) and on adapting in vitro tests to human primary epithelial cell systems.

A joint project involving this in vitro toxicology laboratory and scientists of the Université Laval medical faculty has been supported by a National Health Research and Development Programme (NHRDP) three-year grant for the establishment of human liver cell lines. This project has resulted in four well-characterized cell lines, which are now being used by other investigators (Swierenga et al., 1990d).

A joint study with the University of Ottawa Pathology Department concerns the identification and use of ctyokeratin markers in carcinogenicity/toxicity (Swierenga et al., 1990b).

A further area of research recently initiated in this laboratory is the application of molecular genetic techniques to defining the anti-cancer mechanisms of chemotherapeutic drugs. (This project is presently being continued in the Biotechnology section.)

The senior scientist in the mammalian cell laboratory also acted as a consultant to the WHO and IPCS (International Programme for Chemical Safety) in 1989 on issues in in vitro toxicology.

The Drug Toxicology Division's in vitro toxicology laboratory appears to have established an aggressive and productive program in a field that is currently receiving much research attention in Europe and the US, but which appears still to be largely neglected in Canada.

As a result of an internal reorganization of space and personnel in 1989, the laboratory discussed above no longer exists in its previous form within the Drug Toxicology Division. It has been reassigned, with some program changes, to the Biotechnology Section of the Drug Identification Division.

In 1989-90, studies on in vitro models that may reduce animal use were started in the Drug Identification Division (BDR), in part as a result of the above-mentioned reorganization.

Studies on microbiological systems (Foster, 1989a) have led to an extension of the practicality of microbial models by unequivocally validating the production of the full range of known or suspected mammalian metabolites from several related substrates (Foster et al., 1989b). Among the uses of such microbial models is that of characterizing drug-drug interactions, as in the identification of treatment regimens that may induce adverse reactions.

Studies are in place to identify genetic variants in tumour tissues, which may serve as genetic markers useful in the early diagnosis and characterization of certain cancers.

Analytical methodologies in protein chemistry are the subject of ongoing research in the Division of Drug Identification. These procedures have particular application in establishing criteria for determining the purity, stability and potency of new biotechnological products.

Cell culture activities have been initiated in the Division's Biochemical Toxicology section which is working with rat hepatocyte primary culture for the study of drug metabolism in vitro and as a target for mechanism studies on hepatotoxic drugs. An in vivo/in vitro guinea pig kidney slice procedure has also been introduced in this laboratory for a study on the repeat dose toxicity effects of certain antibiotics on the kidney.

The Reproductive Toxicolgy Section (BDR) has made limited use of early-stage mouse embryos (2-4 day) for drug teratology screening purposes (Buttar et al., 1986). Another procedure in use is the measurement of prostaglandin release as an indicator of vaginal irritancy.

11.1.3 Environmental Health Directorate

The Mutagenesis Section of the Environmental Health Directorate is the best established and largest single unit within HPB devoted specifically to mutagenesis research, research support to the regulatory arm, and methodology R&D.

Scientists from this group have been very active nationally and internationally in representing Health and Welfare's interests in environmental mutagensis at symposia, on international agencies, and in organizing and participating in various symposia on mutagenesis, carcinogenesis, and risk assessment (Douglas et al., 1988). As implied by its name, the main research and testing activities of this section to date have been in the sub-disciplinary field of genetic toxicology.

It is the view of the genetic toxicologists of this section, and indeed of many scientists involved in this field, that insofar as acute toxicity testing is concerned, the prospects for the development of suitable in vitro tests as full replacements are poor.

The rationale for this view is that acute toxic effects of substances reflect their interactions with the pharmacokinetic and metabolic environment of the whole animal, influenced in addition by route of exposure. These are conditions which cannot be duplicated in vitro, where the impact is directly on the cultured cell. Efforts, it is suggested, should be concentrated on developing in vivo protocols that use as few animals as possible.

Scientists of the mutagenesis section played a major role in developing the HPB 1987 document "Use of Genetic Toxicology Tests in Regulations and Research." This document, which is in use within HPB, sets out standards for developing specific guidelines and regulations for mutagenicity testing. A modified edition, entitled Use of Genetic Toxicology Tests in Regulations, is in preparation for public distribution.

The Bureau of Chemical Hazards of the Environmental Health Directorate has also supported, by contract and other financial incentives, several extramural research projects at other Canadian institutions on the development and modification of alternative methodologies.

11.1.4 Food Directorate

Within the Health Protection Branch, in vitro toxicology research and testing is also a concern of the Food Directorate. An active program in this area is carried on in the Genotoxicity and Carcinogenesis section of the toxicology research division. The focus is on the application of in vitro toxicology (largely genotoxicology) to problems of concern to the regulatory arm of the Directorate. In addition to this service function, scientists from this section initiate and collaborate in research having a direct impact on in vitro toxicology testing procedures (Rogers et al., 1988).

A recently completed paper evaluating the reproducibility of four short-term tests with two known genotoxins -- the direct-acting ethyl methane sulfonate (EMS) and the indirect-acting 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) -- concluded that the Sister-Chromated Exchange and Thioguanine Resistance (TGR) assays are more consistently reproducible than the Micronucleus and Ouabain Resistance assays (Boyes et al., 1990).

A new project involves adapting methods of flow cytometry to enhance data collection from in vitro as well as in vivo studies involving immunology, cell proliferation, and ploidy.

11.2 Health of Animals Laboratories

The Biologics Evaluation Unit of the Health of Animals Laboratory Division (HALD) is responsible for the regulation of veterinary biologicals. This unit has a specific initiative requiring that only the minimal necessary number of animals be used in their potency testing program. In each case, test relevance and the availability of an acceptable in vitro alternative must be considered. Test development also involves ongoing studies on direct test assays (enzyme immuno-assay, etc.).

In the area of rabies diagnosis, HALD has actively developed use of the Rabies Tissue Culture Infection Test to replace the mouse inoculation test for confirmation of the presence of rabies virus in human contact animal submissions. This procedure has effectively reduced the use of mice for rabies testing by about 30,000 per annum in Canada. Equally impressive is the fact that the confirmation time frame (risk assessment report) has been reduced from 35 to four days.

11.3 University Toxicology Centres

In 1988, three regional university-based centres for toxicology in Canada formed a Canadian Network of Toxicology Centres. The institutions involved are: Le Centre Interuniversitaire de Recherche en Toxicologie (involving the Université de Montréal and the Université de Québec à Montréal); the Canadian Centre for Toxicology at the University of Guelph; and the Toxicology Research Centre, University of Saskatchewan.

The centres are presently separately engaged in extensive research programs funded by various Canadian agencies. Some of this research concerns methodology development in in vitro toxicology.

The toxicology research group at the University of Montreal and the University of Quebec, Montreal (which constitutes the Eastern Node of the Network of Toxicology Centres), has been concerned in research involving the use and development of in vitro procedures. The present program at the chemistry department of the Université de Québec, Montreal, uses primary cultures of hepatocytes as the cellular model for investigations on the development, improvement, and use of various in vitro systems (membrane probes, monitoring calcium homeostasis, establishing optimal long-term liver cell culture conditions suitable for studies on cell transformation and tumour markers, such as oncomodulin).

Use of flow cytometry and genotoxicity tests are also emphasized in their work, which is supported under NSERC's university/industry program as a joint research endeavour with a major Canadian contract testing laboratory, BioResearche Inc. of Beaconsfield, Quebec.

An ultimate goal is the design of improved in vitro protocols that may eventually influence the introduction and acceptance of better environmental and health protection regulations.

The University of Saskatchewan Toxicology Research Centre constitutes the Western Node of the Canadian Network of Toxicology Centres. Among its current research, the Centre reports on the use of photoluminescent bacteria (the Microtox Bioassay) as a method to determine toxicity in aqueous media. Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) studies have also been conducted and it appears that validation (and acceptance) is not far away. The Toxicology Research Centre has also conducted experiments with Lemna cultures for the prediction of toxicity in plants.

11.4 Other University Programs

In addition to the above centres, research workers at several universities are engaged in research grant supported projects directed toward the development and evaluation of in vitro toxicology methodologies.

In addition, a number of Canadian universities have long-standing departmental commitments to the advancement of tissue culture techniques (Anatomy Department, University of Saskatchewan) and computer simulation (McMaster University) related to toxicological testing. Tissue culture methods have been the focus of work by Dr. S. Federoff, in the Department of Anatomy, University of Saskatchewan, whose annual tissue culture course is widely known and attended. That course was recently awarded a $100,000 equipment grant from the Medical Research Council of Canada and receives annual operating support from the Canadian Council on Animal Care (CCAC). Some four years ago, Dr. Federoff turned to nerve tissue aggregate cultures as a method to study the effects of pesticides. One of the methods developed looks particularly promising and has been published (Segel and Federoff, 1989a,b).

The University of British Columbia runs an annual short course on the fundamentals of tissue culture (coordinated by Dr. D. Mather) open to attendance from the three B.C. universities. This course is funded equally by the University of British Columbia and the British Columbia SPCA as part of those organizations' cooperative approach to the development and advancement of alternative methods to the use of animals in research, teaching, and testing.

The university community as a whole is on record through the Association of Universities and Colleges of Canada as supporting the development and utilization of alternative testing methods (Appendix 5). University community support is further strengthened by the active involvement of the CCAC in these matters. CCAC supports activities for the reduction and refinement of animal use in research and testing and has a standing advisory committee on alternatives (Rowsell, 1987).

Some universities are adopting formal positions concerning the use of animals in testing research and education, presumably in response to perceived or actual public pressures. This is particularly true of universities associated with toxicology centres or medical and veterinary colleges. Appendix 6 is an example of such a proposed position relative to the LD50 and Draize tests.

11.5 Research Grants

Most in vitro toxicology research in Canada is funded by NSERC Strategic Grants in Toxicology. This is the only national granting agency in Canada to have a category for methods and techniques. This category, under the heading of Environmental Toxicology, allows for support of innovative methodology development. In 1987-88, NSERC listed at least 10 research studies that would seem, either directly or indirectly, to have involved the development or modification (improvement) of in vitro testing procedures of a sort pertinent to this report. Total funding for all such investigations was in excess of $1.3 million (NSERC, 1987-88).

Among the other national granting agencies, the National Health Research and Development Programme (NHRDP) of National Health and Welfare has sometimes supported in vitro methodology development research projects if they are clearly health oriented. Such projects do not fit a specific NHRDP category and each is treated as a special case.

One such NHRDP supported project was referred to above (11.1.2, Bureau of Drug Research). Another project funded in 1987 by NHRDP supported the University of Guelph collaboration in a project initiated by the Bureau of Drug Research (BDR). The investigation, initiating from the Drug Toxicology Division of BDR, involved a methods survey on genetic toxicology tests using cultured mammalian cells. The study analysed the numerous and varied protocol modifications in four tests commonly used at different genotoxicity testing laboratories internationally. It recommended standard protocols that are to be published for each of the tests surveyed and for the maintenance of the cell lines implicated (e.g., Swierenga et al., 1990a). The tests surveyed were: mutation assay in Chinese hamster and mouse lymphoma cell lines, cell transformation assays, and chromosome aberration and sister-chromatic exchange assays.

Other national granting programs, such as MRC and NSERC operating grants, will consider methodology development and evaluation proposals. However, these do not fit into their standard review committee (disciplinary) categories. Consequently, their chances of gaining support in competition with basic research proposals are slim.

It is extremely difficult in Canada to find financial support for methodological development research (unless it has clear commercial application and is being developed for profit -- in which case it may qualify for an NRC-IRAP grant). Possibly because of this, such projects often seek support from the US (which may be the first step in the "brain drain" process). The fact that two of the ten projects funded by CAAT Johns Hopkins in the fall of 1988 were Canadian applications concerning sophisticated and innovative studies applicable to methodology development is a case in point. It is also of interest that these were the only two Canadian university-based applications among the 50 candidate project proposals submitted to peer review, and both were funded.

11.6 A Model for Co-operation

The University of British Columbia (UBC)-British Columbia SPCA joint Committee on Alternatives to Live Animals in Research provided funding to five UBC researchers in 1987. Projects included a two-day course in animal cell culture (attended by 28 registrants from the three B.C. universities); a computer modelling study of ischaemic arrhythmogenesis; and a study involving drug interactions with liver metabolizing enzyme systems. Other funded projects involved characterization of a DNA probe for diagnosing toxic strains of the diphtheria bacterium and a study of a freeliving nematode to determine its usefulness as an alternative test organism to the standard mouse lethality assay for paralytic shellfish toxins and some known food contaminants.

The UBC-British Columbia SPCA joint project was started in 1983 as the result of a constructive initiative by the B.C. SPCA. It approached Dr. P. Larkin, then UBC Vice President of Research, to discuss the feasibility of a matching funds program. An annual contribution of at least $10,000 from each organization has been provided for university-selected "alternatives" research projects and, more recently, for support of the annual tissue culture short course. In 1989, the B.C. SPCA and UBC have agreed to put up $25,000 each and to seek a matching $50,000 NSERC grant for the establishment of a Chair in Animal Welfare at UBC to focus on research relevant to alternative procedures to those using animals. Further industry funding will also be solicited for this unique and commendable project.

11.7 Harmonization of Regulations and Guidelines

There are good reasons, other than simply the changing technology and social climate, for reviewing toxicological regulations and testing guidelines at this time. The most important of these is the shifting pattern of world trade, with its trend toward common markets and free trading blocks.

These market adjustments will necessitate greater harmonization and rationalization of import and distribution regulations between trading partners where these may seem to be protective. The reality of this problem was clearly demonstrated in 1989 by the sudden flare-up of controversy in the US and Canada over the use of alar on apples.

Rapid advances in biotechnology and bioengineering assure the continued appearance of such problems, which surely will only be able to be resolved (or preferably avoided) by harmonizing regulations and the acceptance of common guidelines for testing and risk assessment. This process will necessitate agreement on the role and place of numerous in vitro and modified traditional toxicological tests and systems of risk assessment (Ennever et al, 1987; Clayson, 1987).

There has been extensive and accelerated European activity toward these ends, with CEC and OECD playing lead roles, as the 1992 Common Market date draws closer. Canada has played a significant hand in the deliberations of the Chemicals Group of OECD and it is reasonable to hope that that organization may provide a useful forum for the harmonization of our own toxicology guidelines with those of the US and our other trading partners.

It seems fortunate and possibly causally related that so many regulatory agencies in different countries, including Canada, are now reviewing their safety testing regulations and toxicological guidelines for chemicals, other environmental pollutants, pesticides, and pharmaceuticals.

It is to be hoped that these reviews in Canada and elsewhere will give more than lip service to a possible role for mutagenesis testing as a pre-screen. The realities of environmental contamination and the potential health risks implicit in the lack of proper toxicology profiles for so many of the ever-increasing numbers of new products of technology seem to call for the serious consideration of a wider use of the newer in vitro methodologies and a genuine rethinking of regulatory requirements.

REFERENCES

Abernathy, D.J., and Boreiko, C.J., (1987), Promotion of C3H/IOT 1/2: Morphological Transformation by Polychlorinated dibenzo-p-dioxin isomers, Carcinogenesis 8 1485-1490.

Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, Mutat. Res. 31, 347-364.

Ames, B.N., Magaw, M. and Gold, L.S., (1987), Ranking Possible Carcinogenic Hazards, Science 236, 271-280.

Anon., (1987), News and Reports, Vet. Rec. 121, (ii), Sept. 12, 241-242.

Anon., (1988), The FDA and Trends in Animal Testing, US Regulatory Reporter 4,3-7.

Balls, M., (1987), The OTA Report: A Critical Appraisal, ATLA 14, 289-306.

Bass, R., (1986), Reproduction Toxicity, in: Proceedings OECD Seminar On Chemicals Testing and Animal Welfare, National Chemicals' Inspectorate, Stockholm, 201-219.

Bass, R., (1988), Alternatives to Animal Experimentation: What Have the Regulatory Authorities in Europe Done? Swiss Pharma. 10, (10a), 28-29.

Blakey, D.H., Duncan, H.M.V., Wargovich, M.J., Goldberg, M.T., Bruce, W.R., and Heddle, J.A., Detection of Nuclear Anomalies in the Colonic Epithelium of the Mouse, 1985, Cancer Res. 45, 242-249.

Boyes, B.G., Rogers, C.G., Karpinski, K., and Stapley, R., (1990), A Statistical Evaluation of the Reproducibility of Micronucleus, Sister-Chromated Exchange, Thioguanine-Resistance and Oubaine Resistance Assays in V79 Cells Exposed to Ethyl Methane Sulfonate and 7,12-Dimethylbenz(A)Anthracene, Mutation Research, in press.

Brinkhorst, L.J., (1988), Welcome address of the E.C. Commission to the Symposium, Animal Experimentation and Validated Alternatives: Problems and Perspectives, EFPIA Brussels, May 1988, Swiss. Pharma. 10 (10a), 8-9.

Brockman, H.E., and DeMarini, D.M., (1988), Utility of Short-Term Tests for Genetic Toxicity in the Aftermath of the NTP's Analysis of 73 Chemicals, Environ. Molec. Mutagen. 11, 421-435.

Bruce, R.D., (1987), A Confirmatory Study of the Up-and-Down Method for Acute Oral Toxicity Testing, Fundam. Appl. Toxicol. 8, 97-100.

Buttar, H.S., Bura, C., and Moffatt, J.H., (1986) The in vitro Effects of Benzalkorium Chloride on Preimplanation Mouse Embryos, Teratology 33, 64C.

Butterworth, B.E., (1987), Non-Genotoxic Carcinogens, CIIT Activities, 7, 1-6.

Cembella, A., and Todd, E., (1990), Algae in Sea Food and Drinking Water in Palle Krogh, Ed., Control Measures in Shell Fish and Fin Fish Industries, Chapt. 12, Academic Press, London, UK, in press.

Cano, J.P., (1988), Alternatives to Animal Experimentation: What has Industry done? Swiss. Pharma. 10 (10a), 25-26.

Clayson, D.B., (1987), The Need for Biological Risk Assessment in Reaching Decisions about Carcinogens, Mutat. Res. 185, 243-269.

Cohen, C., (1986), The Case for the Use of Animals in Biomedical Research, New Eng. Jour. Med. 315, 865-870.

Contreras, G., (1987), Biologicals for Human Use: in Proceedings of Symposium on Reducing Animal Use in Toxicity Testing in Canada and Internationally, Canadian Federation of Humane Societies, 33-37.

Dean, J.H., Thurmond, L.M. and Rosenbaum, D.J., (1986a), Immunotoxicology: Reduced Animal Usage Through the Use of in vitro Lymphoid Cell Models in Proceedings of an OECD Seminar on Chemicals Testing and Animal Welfare, National Chemical Inspectorate, Stockholm, 232-248.

Dean, J.H., Lauer, L.D., House, R.V. and Thurmond, L.M., (1986b), Immunomodulation: Assessing the Immuno-enhancing and Immunosuppressive Properties of Xenobiotics, in: Toxicology of the Nineties a CIBA-GEIGY International Toxicology Workshop 1985, Mary Ann Liebert Inc. Publ., 47-58.

Douglas, G.R., Blakey, D.H. and Clayson, D.B., (1988), Genotoxicity Tests as Predictors of Carcinogenesis: An Analysis., Mutation Research 196, 83-93.

Draize, J.H., Woodward, G. and Calvery, H.O., (1944), Method for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes, J. Pharm. Exper. 82, 377-389.

ECETOC (1984), European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, The EEC Sixth Amendment: A Guide to Risk Evaluation for Effects on Human Health, ECETOC Technical Report #14, Brussels, 40.

ECETOC (1985), European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, Acute Toxicity Tests LD50 (LC50) Determinations and Alternatives, ECETOC Monograph #6, Brussels, 38.

ECETOC (1986), European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, Structure Activity Relationships in Toxicology and Ecotoxicology: An Assessment, ECETOC Monograph #8, 88.

ECETOC (1988), European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, Eye Irritation Testing, ECETOC Monograph #11, 65.

Ennever, F.K., Noonan, T.J. and Rosenkranz, H.S., (1987), The Predictability of Animal Bioassays and Short-Term Genotoxicity Tests for Carcinogenicity and Non-Carcinogenicity in Humans, Mutagenesis 2: 73-78.

Enselin, K., (1988), An Overview of Structure-activity Relationship as an Alternative to Testing in Animals for Carcinogenicity, Mutagenicity, Dermal and Eye Irritation and Acute Oral Toxicity, Toxicol. Indust. Health 4, 479-498.

Foster, B.C., Coutts, R.T., and Pasutto, F.M., (1989a), Biotransformation of Arylalkylamines by Cunninghamella echinulata, Xenobiotica 19, 531-538.

Foster, B.C., Wilson, D.L., and McGilveray, I.J., (1989b), Effect of Sparteine and Quinidine on the Metabolism of Methoxyphenamine by Cunninghamella echinulata, Xenobiotica 19, 445-452.

FDR Bundesanzeiger, (1989) No. 96, 27 May, 2583.

FRAME News (1989a) "Cruelty Free" Labelling a Cruel Deception?" No. 22, 1.

FRAME News (1989b), "Cosmetic Testing: A Summer of Intense Activity" No. 23, 10-11.

Francis, E.Z., and Farland, W.H., (1987), Application of the Preliminary Developmental Toxicity Screen for Chemical Hazard Identification Under the Toxic Substances Control Act, Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 7, 107-117.

Frazier, J.M., Gad, S.C., Goldberg, A.M., McCully, J.P., and Meyer, D.R., (1987), A Critical Evaluation of Acute Occular Irritation Testing, in: Alternative Methods in Toxicology, Vol. 4, Mary Ann Liebert Inc., New York.

Gad, S.C., and Weil, C.S., (1982), Statistics for Toxicologists, in: A.W. Hays, ed., Methods in Toxicology, Raven Press, N.Y., 273-309.

Goldberg, A.M., (1986), Alternatives in Toxicology, Problems and Opportunities, in: Proceedings of OECD Seminar on Chemicals, Testing and Animal Welfare, National Chemicals Inspectorate, Stockholm, 249-260.
Home Office U.K., (1979), Report on the LD50, Home Office London, 31.

IARC, International Agency for Research on Cancer, (1987), Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Overall Evaluation of Carcinogenicity, An Update of IARC Monographs 1-42, Supp. 7, IARC, Lyon.

IRRC, (1989), Investor Responsibility Research Center, Social Issues Service: Animal Testing and Alternatives for Consumer Product Safety, IRRC Analysis J., Washington, D.C., 19.

Kennedy, Jr., G.L., Ferenz, R.L., and Burgess, B.A., (1986), Estimation of Acute Oral Toxicity in Rats by Determination of the Approximate Lethal Dose Rather than the LD50, J. Appl. Toxicol. 6, 145-148.

Lave, L.B., (1986), Using Economic Data and Short-Term Tests, in: Proceedings of OECD Seminar on Chemical Testing and Animal Welfare, National Chemicals Inspectorate, Stockholm, 99-109.

Lave, L.B., Ennever, F.K., Rosenkranz, H.S. and Olmenn, G.S. (1988), Information value of the rodent bioassay, Nature 336, 631-633.

Lohman, P.H.M., Vijg, J., Uitterlinden, A.G., Slagboom, P., Gossen, J.A., and Berends, F., (1987), DNA Methods for Detecting and Analyzing Mutations in vivo, Mutat. Res. 181, 227-234.

Lonngren, R., (1986), Chairman's Concluding Remarks, in: Proceedings: OECD Seminar on Chemical Testing and Animal Welfare, National Chemical Inspectorate, Stockholm, 320-326.

McCormick, H., (1987), Animals and Alternatives: Economic and Political Considerations, ATLA 14, 353-360.

Maier, P., (1984), The Granuloma Pouch Assay in F.J. De Serres, ed., Chemical Mutagens, Vol. 9, Plenum Publ. Corp., N.Y., 233-260.

Matula, T.I., Wood, R.J., and Hughes, D.W., (1990), Application of a Bacterial Cell Reactivity Assay to the Evaluation of Drug Safety, Drug Safety 1, in press.

Morrissey, R.E., Lamb IV, J.C., Schwetz, B.A., Teague, J.L. and Morris, R.W., (1988), Association of Sperm, Vaginal Cytology and Reproductive-organ Weight Data with Results of Continuous Breeding Reproductive Studies in Swiss (CD-1) Mice, Fund. and Appl. Toxicol. II, 359-371.

NAS-NRC (1984), National Academy of Sciences, National Research Council, Toxicity Testing: Strategies to Determine Needs and Priorities, Washington, D.C., National Academy Press, 382.

NRC (1988), National Research Council, The Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioural Research, Washington, D.C., National Academy Press, 102.

NSERC (1988), Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Strategic Grants in Environmental Toxicology, 1987-88, 65.

OTA, (1986), US Congress, Office of Technology Assessment, Alternatives to Animal Use in Research, Testing and Education, (Washington, D.C., US Government Printing Office, OTA-BA-273, Feb. 1986), 441.

Prival, M.J. and Dunkel, V.C., (1989), Reevaluation of the Mutagenicity and Carcinogenicity of Chemicals Previously Identified as "False Positives" in the Salmonella typhimurium Mutagenicity Assay, Environ. Mutagen. 1, 1-24.

Ramel, C., (1986), Genotoxicity, in: Proceedings OECD Seminar on Chemical Testing and Animal Welfare, National Chemicals Inspectorate, Stockholm, 194-200.

Roberfroid, M., (1988), Introduction to the Presentation of the 1988 Award during the Symposium: Animal Experimentation and Validated Alternatives: Problems and Perspectives, Swiss Pharma. 10 (10a), 10-12.

Rogers, C.G., Boyes, B.G., Matula, T.I., Heroux-Metcalf, C., and Clayson, D.B., (1988), A Case Report: A Multiple End-point Approach to Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of Erythrosine (FD and C Red No. 3) in a V79 Hepatocyte-mediated Mutation Assay, Mutat. Res. 205, 415-423.

Rowsell, H.C., (1987), Animals or Replacements: The Canadian Council on Animal Care (CCAC) Perspective, in: C.E. Connolley-Mendoza ed., Proceedings of CCAC Workshop on Alternatives to Animals in Research, (September 1987), Suffield Special Publication No. 122, Suffield, Alberta.

Schelde, E., Maurer, T., Potokar, M., Schmidt, W.M., Schulz, K.M., Roll, R., and Kayser, D. (1989) A Differentiated Approach to Testing Skin Sensitization. Proposal for a New Test Guideline Skin Sensitization. Arch. Toxicol. 63, 81-84.

Schop, R.N. and Goldberg, A.M., (1988), Nongenotoxicity of Minoxidil in mouse hair follicles as determined by the Nuclear Aberration Assay, Toxicol. Appl. Pharm. 92, 150-154.

Segal, L.M. and Federoff, S., (1989a), Cholinesterase Inhibition in Agregate Cultures of Neural Cells from the Fetal Rat Brain by Organophosphorous and Carbamate Pesticides: The Effect of Metabolic Activation and Pesticide Mixtures, Toxicol. in Vitro 3 (2), in press.

Segal, L.M. and Federoff, S., (1989b), The Acute and Sub-Chronic Effects of Organophosphorous and Carbamate Pesticides on Cholinesterase Activity in agregate Cultures of Neural Cells from the Rat Brain, Toxicol. in Vitro 3 (2), in press.

Selye, H., (1952), Use of Granuloma Pouch Technique in the Study of Antiphlogistic Corticoids, Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 82, 328-333.

Shelby, M.D., and Stasiewicz, S., (1984), Chemicals Showing No Evidence of Carcinogenicity in Long-term, Two-species Rodent Studies: The Need for Short-term Test Data, Environ. Mutagen. 6, 871-878.

Silano, V., Stammati, A., and Vittozzi, L., (1986), Possibilities for in vitro Methods, in Proceedings of an OECD Seminar on Chemical Testing and Animal Welfare, National Chemical Inspectorate, Stockholm, 152-182.

Sivak, J.G., Gershon, D., Dovrat, A. and Weerheim, J., (1987), Ocular Lens Organ Culture System for in vitro Toxicology, in: A.M. Goldberg ed. Alternative Methods in Toxicology Series, Vol. 5, 499-506.

Swierenga, S.H.H. (1985) Use of Low Calcium Medium In Carcinogenicity Testing: Studies with Rat Liver Cells, in In Vitro Models for Cancer Resaerch, Vol. II, M.M. Webber, ed., CRC Press, 61-89.

Swierenga, S.H.H., Brillinger, R.L., Gilman, J.P.W. and Nestmann, E.R., (1990a), Standard Protocols based on Survey of Current Practices in Genotoxicity Testing Laboratories I. Unscheduled DNA Synthesis in Rat Hepatocyte Cultures, Mutat. Res., in press.

Swierenga, S.H.H., Lee, J.F., and Hasnain, S.H., (1990b), Cytotoxicity and Genotoxicity of Benzoyl Peroxide, Toxicology In Vitro in press.

Swierenga, S.H.H., Marceau, N., Katsuma, Y., French, S.W., Mueller, R., and Lee, F., (1990c), Altered Cytokeratin Expression and Differentiation Induction During Neoplastic Transformation of Cultured Rat Liver Cells by Nickel Subsulfide. Cell Biol. Toxicol. 5, 271-286.

Swierenga, S.H.H., Yamasaki, H., Piccoli, C., Robertson, L., Bourgon, L., Marceau, N. Fitzgerald, D.J., (1990d), Effects of Intercellular Communication in Human Keratinocytes and Liver-Derived Cells of Poly-chlorinated Biphenyl Congeners with Differing In Vivo Promotion Activities, Carginogenesis, in press.

Tennant, R.W., Margolin, B.H., Shelby, M.D., Zeiger, E., Haseman, J.K., Spalding, J., Caspary, W., Resnick, M., Stasiewicz, S., Anderson, B. and Minor, (1987), Prediction of Chemical Carcinogenicity in Rodents from In Vitro Genetic Toxicity Assays, Science 236, 933-941.

Thakur, A.K., and Fezio, W.L., (1981), A Computer Program Estimating LD50 and Its Confidence Limits Using Modified Behrens-Reed-Muench Cumulant Method, Drug Chem. Toxicol. 4, 297-305.

Trethewey, J., Baxter, D., Fisher, B.V., Sabey, G.A. and Webb, F.W., (1986), The Reduction in the Number of Animals Used in the Biological Assay of Insulin, Develop. Biol. Standard. 64, 221-226.

Trevan, J.W., (1927), The Error of determination of Toxicity, Proc. Royal Society, London, 101-B, 483.

University of California, (1988), Report of the Animal Alternatives Task Force, University of California, Berkley, California, 54.

Upton, A.C. (1986) Availability of Toxicology Data on Existing Chemicals, in: Proceedings OECD Seminar on Chemical Testing and Animal Welfare. National Chemcials Inspectorate, Stockholm, 21-43.

Ungar, K., Atkinson, K. and Steer, S. (1990) INVITTOX Protocols, ATLA, 17, 407-410.

Vijay, H.M., Burton, M., Young, N.M., Corlette, M., and Bernstein, I.L., (1989), Comparative Studies of Allergens from Mycelia and Culture Media of Four New Strains of Alternaria tenius, GRAMA 28, 53-61.

Waters, M.D., Stack, H.F., Rabinowitz and Garrett, N.E., (1988), Genetic Activity Profiles and Pattern Recognition in Test Battery Selection, Mutat. Res. 205, 119-138, Stockholm, October 1988.

Zack, J.A. and Suskind, R.R., (1980), The Mortality Experience of Workers Exposed to Tetrchlorodibenzobioxin in a Trichlorophenol Process Accident, J. Occup. Med. 22, 11-14.

Zbinden, G. and Flury-Roversi, M., (1981), Significance of the LD50 Test for the Toxicological Evaluation of Chemical Substances, Arch. Toxicol. 47, 79-99.

Zbinden, G., (1986), Acute Toxicity, in: Proceedings OECD Seminar on Chemical Testing and Animal Welfare, National Chemicals Inspectorate, Stockholm, 183-193.

Zbinden, G., (1988), The Prospects for Alternative Methods in Biomedical Research, Development and Production, Swiss Pharma, 10 (10a), 16-17.

APPENDIX 1

FIXED DOSE PROCEDURE (FDP)

INTERNATIONAL COLLABORATIVE STUDY ACUTE ORAL TOXICITY TESTING OF SUBSTANCES AND PREPARATIONS*

Introduction

1. The generally accepted methods for assessing acute oral toxicity are based upon graduated dose procedures in which groups of laboratory animals are exposed to a range of dose levels with the top dose chosen to produce a high level of mortality. These procedures were codified in the internationally agreed guideline (No. 401) published by the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) in 1981. This guideline suggested the exposure of rats to at least 3 dose levels (5 male and 5 female rats at each level), with the dose levels being chosen to span the "expected" LD50 . The expected LD50 dose was to be estimated by analogy with similar compounds or from a pilot or sighting study and, where it was anticipated that no compound-related deaths would occur at a dose level of 5000 mg/kg body weight, the study could be reduced to an examination of the toxic effects at that single dose level (the so-called "limit" test). Guide line 401 was revised in 1987, the principal changes being a reduction in the number of animals used (from 30 to 20) and reduction of the limit test dose to 2000 mg/kg body weight.

2. When properly conducted, this type of acute toxicity investigation - often referred to as an LD50 study - can provide data not just on the doses of the test material which may prove lethal but, more importantly, on the dose response to the test substance including information on the nature, time to onset, and outcome of signs of toxicity. This latter information is essential for effective human health and environmental assessment. In many studies it is also possible to statistically estimate the LD50 dose. These estimates, in spite of their recognised limitations, are considered important by regulatory authorities in the context of classification and labelling.

*This study has now been completed (ALTA 17, 63-64) and a "Proposal for a New OECD Guideline, "Acute Oral Toxicity, Fixed Dose Method" is under review by members of the OECD Update Panel. The original protocol proposal, instructions and study rationale is reproduced here to draw attention to the complexity of such undertakings.

International co-operation and leadership are essential to the general acceptance of a validation study and if it is to have the desired impact on national regulations.

3. For some years, the rationale behind the methodology used to generate LD50 figures has been called into question by workers in the field of toxicology both on scientific grounds and ethically in relation to the humaneness of the procedures. At the same time, toxicologists accept that for the foreseeable future there will be a continuing need to investigate acute toxicity of materials in vivo not only for the purpose of protecting man and other animals from acute poisoning but also to obtain the important risk-assessment data on likely nature and time to onset of significant signs of toxicity and on the probable rate and extent of recovery from sub-lethal doses. An alternative procedure which is scientifically and ethically more acceptable, but which would continue to provide the information needed by risk assessors and managers, is thus urgently required.

4. In 1984, a new approach to acute toxicity testing was suggested by the British Toxicology Society (BTS) based upon a fixed-dose procedure. This avoided using death of animals as an end-point, and relied instead on the observation of clear signs of toxicity developed at one of a series of fixed dose levels. The dose levels at which toxic signs were detected could, it was claimed, be used to classify the test materials, and because deaths would not determine classification, any animal thought to be suffering unduly could be sacrificed without affecting the results of the study. The lower sub-lethal doses prescribed by the method would tend to reduce the severity of toxic signs. Both these latter points would make the study more acceptable from the ethical, animal welfare, point of view. It was considered that, carefully conducted, the study should also reduce the number of animals used, possibly to as few as 10 rats. Although a dose-response curve would not be generated, compounds with high LD50 figures but which nevertheless produced severe toxic effects at low doses (i.e. compounds with shallow dose-response curves) would, in some cases, rightly attract a more severe toxicity classification than the LD50 figure alone would have allocated. Lastly, there were reasons to believe that less inter-laboratory variation of classification would result from use of the method than was the case with current procedures which relied on notoriously unreliable estimated LD50s.

5. The fixed-dose procedure has been subjected to a validation study in the UK and the results have been published (Human Toxicology, 1987, 6, 279). This indicated that an alternative to the conventional acute toxicity study which is both scientifically and ethically more acceptable may now exist. In spite of the results of the UK study, it would be unrealistic to expect that the fixed-dose procedure could be immediately adopted by laboratories, given the international nature of the industry and the differing national requirements of regulatory authorities. A further and this time international validation study is now being carried out. This study will examine again the aspects looked at in the UK exercise but additionally will look at inter-laboratory variation.

6. The validation study will be carried out under the patronage of the OECD with the UK as lead country and to encourage participation by as many countries as possible. The Commission of the European Communities (CEC) has agreed to sponsor the study.*

Study Assessors

7. A small group of assessors drawn from the UK Government and Industry under a principal study coordinator has been established to control the conduct of the study, coordinate the activities of those involved, evaluate and interpret the results of the exercise, and prepare a final report. The results will be discussed at a meeting being organised by the CEC in Munich, 19-21 September 1989.

8. It is anticipated that all studies will be conducted in accordance with the OECD Principles of Good Laboratory Practice, although observation of critical phases and auditing of final reports by QA is not essential and will be at the discretion of the laboratory.

Laboratory Involvement

9. Major toxicology laboratories in some twelve countries are taking part in the study. It is likely that only token financial support for the experimental work involved will be available to laboratories. It will be possible to acknowledge the contributions of laboratories (unless they do not wish it) in any report of the exercise, but individual laboratory results will not be identified by the assessors.

Selection of Test Substances

10. Not more than 20 materials currently on the market will be selected for study. These "test substances" will be industrial chemicals and pesticides and may include both technical (pure) substances and preparations. They will be chosen on the basis of existing rat oral LD50 figures, to span the full range from very toxic to relatively innocuous, and will cover both oil and water soluble and insoluble materials and include a range of chemical structures.

*It should be noted that the Fixed Dose Test is being proposed as an alternate, not a replacement, test. It seemingly will use on the average only three animals less per chemical tested than the OECD 1987 revised LD50 Guideline. Even though death is no longer the required test end-point and thus the Fixed Dose Test is ethically more acceptable, it would still seem that further changes are desirable.

11. The materials will be stable under normal room temperatures and humidities. They will be ode numbered by the supplier so as to ensure the studies are conducted "blind". The supplier will complete a Data Sheet for each test substance which will include essential background information on the material, indicate the dosing vehicle to be used and provide guidance on the preparation of the dosing material. A traditional acute oral toxicity study (OECD Test Guideline 401) will be carried out by Huntingdon Research (UK) on each of the test substances to provide a "traditional" reference point for the evaluation of the results of the study.

12. It is desirable that each laboratory investigate every one of the test substances. Laboratories taking part will be supplied with an adequate quantity of each test substance.

Test Procedure

13. The test substance s are to be examined using the procedure given in Annex 1. To ensure that the procedure is well understood by those who will actually conduct the studies, laboratory study directors engaged in the exercise are invited to contact the UK principal study coordinator in respect of any problems they may have both before commencing the studies or during them. Such questions should be addressed by letter, telex or telephone to:

Mr. M J van den Heuvel (or Dr R. Fielder)
Department of Health, Room 911
Hannibal House
Elephant & Castle
London SE1 6TE
Telex 883669
Telephone 01-703-6380 Extns 4584, 3080 or 3891

and it is to this office that final reports of the tests should be sent.

Timetable

14. It is very important that laboratories taking part in the study make every effort to carry out the tests as soon as practicable after receipt of the test compounds in November, and return all test reports to the contact point by March\April 1989.

Reporting of Results

15. Laboratories are asked to prepare a report (in English) on each substance they test and to simplify and harmonize this procedure, a Test Report form is attached at Annex 2. Please note that where more than one test has to be conducted on the same test substances, a separate report for each test should be completed.

16. The evaluation of the reports by the assessors will include:

(i) A comparison of the information on signs of toxicity, etc., obtained in a fixed-dose study with that obtained in a traditional acute oral toxicity study on the same substance;

(ii) the usefulness of the results of the fixed-dose studies in ranking the test substances, particularly in relation to the various classification systems in current use in OECD countries;
(iii) an assessment of the advantages for animal welfare of the fixed dose procedure in relation to the traditional procedure:
(iv) an analysis to determine the need to use both sexes in the fixed dose procedure;
(v) an analysis to confirm the consistency of results between laboratories.

Appendix 1
Annex 1

INTERNATIONAL COLLABORATIVE STUDY ON ACUTE TOXICITY TESTING PROTOCOL

ACUTE ORAL TOXICITY - FIXED DOSE PROCEDURE

1. Introductory Information

Prerequisites:
- Solid or liquid test substance
- Data sheet on test substance

Standard Documents:
- There are no relevant international standards

2. Principle of the Test Method

This procedure is designed as a replacement for the traditional acute oral toxicity study or LD50 study as it is sometimes called.

The test substance is administered orally by gavage at a single dose level to a group of rats. The dose used is selected from a series of fixed, pre-set dose levels. The dose selected is that which is judged likely to produce evident toxicity[1], but no deaths. Where no information is available from which to predict the likely toxicity of the test substance, a preliminary "sighting" study, using three to six animals, is carred out.

Following administration of the test substance, the rats are observed closely for any effects. Animals killed for humane reasons because they are obviously in pain or are showing signs of severe distress and all those which die during the test, are necropsied. At the conclusion of the test the remaining animals are necropsied. Where evident toxicity is not seen at the chosen dose level, the substance should be re-tested at the pre-set next highest dose level. Where animals die or a severe toxic reaction requires the removal of animals from the study, for animal welfare reasons, the substance should be re-tested at the specified next lower dose level. The dose level which produces evident toxicity, but no mortality, is used to allocate the test substance to a toxicity class.

---

[1]Evident toxicity is a general term describing clear signs of compound-related toxicity, but not such as to cause very severe pain, distress or mortality. A significant increase in the dose administered, e.g., to the next highest pre-set level, can be expected to result in the development of very severe toxic signs and probably mortality.

3. Description of the Test Procedure

Preparations:
- Healthy young adult rats should be randomly selected and acclimatized to the laboratory conditions for at least five days prior to the test.

- Where necessary, the test substance is dissolved or suspended in the vehicle indicated on the data sheet. The maximum volume of liquid that should be administered should not exceed l ml/100g body weight, except in the case of aqueous solutions where up to 2 ml/100g may be used.

Experimental Animals:
- A commonly used laboratory strain of rat should be employed. The weight variation of animals used in a test should not exceed +20 per cent of the mean weight.

Number and Sex:
- Three to six animals (males or females) are used in the sighting study. Ten animals (5 female and 5 male) should be used for each dose level which is investigated in the main test. The females should be nulliparous and non-pregnant.

Housing and Feeding Conditions:
- The temperature of the experimental animal room should be 22°C (+3° and the relative humidity 30-70 per cent. Animals may e group-caged by sex, but the number of animals per cage should not interfere with clear observation of each animal. Where the lighting is artificial, the sequence should be 12 hours light, 12 hours dar. For feeding, conventional laboratory diets may e used with an unlimited supply of drinking water.

Test Procedure:
- Because this study is being conducted "blind", laboratories will have no indications as to the toxicity of a test substance. They will, therefore, have to carry out the study in two parts
  - a sighting study
  - the main test

1. The "Sighting" Study

This exercise is not an integral part of the 'fixed dose' procedure and no report relating to it is required by the assessors. The object of the sighting study is to determine the single dose level to be used in the main test. It is suggested that three groups of one male and one female rat should be dosed at 5, 50 and 500 mg test substance per kg of body weight and observed for signs of toxicity. The dose level (5, 50 or 500 mg\kg) which results in evident toxicity (see definition) but no mortality should be identified. (Note: Mortality includes animals killed for humane reasons but not accidental deaths). If evident toxicity is not seen at a dose level of 500 mg/kg body weight, the dose to be used in the main test is 2000mg/kg body weight.

2. The Main Test

Ten rats (5 male and 5 female) are used. Animals should be fasted prior to substance administration by withholding food overnight.

Following the period of fasting, the animals should be weighed and then the test substance administered in a single dose by gavage using a stomach tube or a suitable intubation cannula. The dose administered should be that identified in the sighting study. After the dosing food should be withheld for a further 3-4 hours.

Following administration of the test substance, cageside observations are made and recorded with individual records being maintained for each animal. For the purpose of this collaborative study, frequent observations for clinical signs of toxicity are desirable. A careful clinical examination should therefore e made at least twice on the day of dosing and twice a day thereafter if signs of toxicity persist. Any animals suffering severe pain or showing clear signs of distress should be humanely killed, but observation of the remaining animals in the group should continue for a full 14 days. Animals which die during the test and/or those killed for humane reasons should be necropsied. At the conclusion of the 14-day observation period the remaining animals are necropsied.

It may be very quickly become obvious to the Study Director that, in spite of the sighting study, the dose administered as too high (resulting in deaths or the need to remove animals from the study for humane reasons) or was too low (resulting in no clear signs of toxicity). In either case, it will be necessary to repeat the study using a further ten rats at the next lower or higher dose level, as appropriate. Reference should be made to page 5 of this protocol where full details are given of the action to be taken in each case.

Clinical Examinations:

- Except where a test is prematurely terminated for humane reasons the observation period should be 14 days. The time at which signs of toxicity appear and disappear are important, especially if there is a tendency for toxic signs to be delayed. Observations should include changes in the skin, fur, eyes and mucous membranes, and also respiratory, circulatory, autonomic and central nervous system, and somatomotor activity and behaviour pattern. Individual body weights should be determined shortly before the test substance is administered. Animals should be weighed daily during the first week and at death. At the end of the test surviving animals are weighed and then sacrificed.

Pathology:

- All test animals should be subjected to gross necropsy. All gross pathological findings should be recorded.

Test Report:

- To harmonize the reporting of results, a standard form has been designed for completion by the Study director. The assessors will be grateful if participating laboratories would use the proposed format, as this will simplify the task of analyzing the results.
- One form should be completed for each substance and each dose level tested. No other report is required, but comments from laboratories on any aspect of their experience in using the fixed dose procedure will be welcomed.

Interpretation of Results:

- The results of the collaborative study will be interpreted by the Steering Committee and their evaluation will be presented at a meeting sponsored by the European Commission and to be held in Munich, West Germany, on 19-21 September 1989. For this reason, laboratories are not required to interpret the results they obtain.

INVESTIGATION OF ACUTE ORAL TOXICITY - FIXED DOSE PROCEDURE

DOSE	RESULT	ACTION
5 mg/kg*	Less than 100% survival**	REPORT RESULTS
	100% survival; but evident toxicity	REPORT RESULTS
	100& survival; no evident toxicity	Retest at 50 mg/kg. If always tested at that dose, report results of both tests.
50 mg/kg	Less than 100% survival**	Retest at 5 mg/kg. If already tested at that dose, report results of both tests.
	100% survival; but evident toxicity	REPORT RESULTS
	100% survival; no evident toxicity	Retest at 500 mg/kg. If already tested at that dose, report results of both tests.
500 mg/kg	Less than 100% survival	Results at 50 mg/kg. If already tested at that dose, report results of both tests.
	100% survival; but evident toxicity	REPORT RESULTS
	100% survival; no evident toxicity	Retest at 2000 mg/kg. If already tested a that dose, report results of both tests.
2000 mg/kg	Less than 100% survival**	Retest at 500 mg/kg. If already tested at that same dose, report results of both tests.
	100% survival; with or without evident toxicity	REPORT RESULTS

* For the purposes of the International Collaborative Study effects at doses below 5mg/kg body weight need not be investigated.

** Includes compound related mortality and humane kills, but not accidental deaths.

APPENDIX 2
SOCIETY OF TOXICOLOGY OF CANADA
POSITION PAPER ON THE LD50[1]

Historical Background:

In the early part of the 20th Century, many medicinal agents in use were available as impure mixtures or extracts of biologically derived materials ("biologicals") rather than as pure chemical forms. It was often difficult to prepare uniform products by such processes, since the amount of "active" ingredient varied considerably from product to product. For several of these agents, the active therapeutic potency of the mixture cold be correlated with the lethal potency of the mixture or extract. If one could calculate with precision the lethal potency of the material, one could indirectly assess the therapeutic potency of the same material. Effective therapeutic "dosages" for biologicals were often expressed in "units of activity" rather than in units of weight. Thus, quantitative methods were devised to assess lethal potency with precision, as a means of establishing standardization of biologically derived medicinal agents.

For statistical reasons, the median lethal dosage (LD50, the dosage estimated to kill 50% of the universal population of the species under test) was found to be the most accurate means of quantifying lethal potency. Furthermore, the mathematical precision of the statistically estimated LD50 was found to be directly related to the number of animals that were subjected to each test dose and the number of dosage levels (yielding values between 10% and 90% mortality)utilized to derive the lethality dose-response data. Thus, the LD50 was introduced in pharmacology and toxicology because of an important need in the estimation of potency of certain classes of medicinal agents.

A more general application of the LD50 determination followed. The quantification of lethality became widespread. The LD50 became one of the first quantifiable experimental tools available to the toxicologist. With such a tool, toxicologists could classify and compare chemicals according to their quantitative lethal potencies. Extrapolations to the potential dangers to humans due to acute exposures to relatively large amounts of chemicals were made on the basis of LD50 data derived in animals. These determinations were carried out in a variety of species and by different routes of administration.

Present Situation:

One cannot discuss the utility of the so-called "LD50 test" in isolation. The assessment of life-threatening qualities of chemicals is an absolutely essential component of the safety evaluation process employed for the toxicological evaluation of diverse chemical substances, such as medicinal agents, cosmetics, food additives, pesticides, chemicals encountered in the household or the occupational setting, chemicals encountered in recreation or hobbycrafts, and

---

[1] Adopted at the STC Annual Meeting on December 3, 1985.

chemicals dispersed in the environment. The toxicologist determines the potentially adverse effects that such substances night cause when various living species are exposed to chemicals under a variety of conditions. The species of greatest interest is of course the human being, but it is important to realize that many other mammalian and nonmammalian species can be the biological target of concern.

The assessment of the lethal properties of chemicals is usually associated with the acute toxicity phase of the safety evaluation process. Both the dosages and the exposure conditions that lead to the lethal response must be established in properly performed toxicological assessments. If humans are likely to come in contact with a particular chemical (voluntarily or involuntarily, accidentally or by design), one must know where the lethal range exists, if these individuals are to be protected. The safe handling of potentially lethal chemicals depends on adequate knowledge of lethal dosages and exposure conditions. The design of treatment procedures or specific antidotes to be used in the case of chemical intoxications depends on adequate knowledge of the lethal process. Questions raised regarding the precision one needs when performing the "LD50 test" are legitimate questions. On the other hand, questions dealing with the necessity of lethality assessment must be rational and in keeping with the responsibility of protecting society.

Large amounts of LD50 data have been accumulated; their utility has been questioned by a number of toxicologists. Toxicologists have deplored the misuse of the LD50 value as a kind of "biological constant." Variability is the rule in biology. This is also true when the biological response is death. LD50 values exhibit both interspecies and intraspecies variation. Furthermore, factors such as age, nutritional state and environmental conditions are known to affect lethal potency. Thus the LD50 value, regardless of its precision, can never be regarded as a constant.

Toxicologists also realize that a precisely determined (in a statistical sense) LD50 value(with its 95% fiducial limits) is still only an estimate of the situation that may prevail in the population of species under test. In view of the well known interspecies variation, is great precision really necessary? Toxicologists are questioning the need for precision in the determination of LD50 values.

Toxicologists can obtain significant information on lethal potency and the process leading to lethality without the calculation of a precise LD50 value (one with very small 95% fiducial limits). It is important that the animals given lethal or near-lethal dosages be observed closely to gain knowledge of the functional and pathological alterations manifested by the animals. Questions regarding lethal potency can be resolved by the use of less precise statistical estimates than the ones traditionally employed to calculate LD50 values. Methods that require fewer numbers of animals can certainly be used to estimate an LD50 value or to yield a reasonable estimate of the dosages that border the lethal range. It is doubtful that much meaningful knowledge is lost by the application of such techniques in the safety evaluation process. On the other hand, a more complete examination of the animals employed to estimate lethal potency is to be encouraged. More can be done to obtain more meaningful biological data from animals used in lethality studies.

Questions have been raised about the utility of determining LD50 values in a number of different animal species. It must be remembered that one of the goals of the safety evaluation process is to provide data where one can extrapolate the findings observed in laboratory animals to the potentially adverse effects that might be observed in humans, domestic and wild animals, or animals in captivity exposed to the same chemicals. If the lethal dosage of the chemical is found to be similar in several species, extrapolation of toxicity to humans is more secure. If similar toxicological effects are observed in several animal species, it is probable that a common mechanism of action is involved in these species and probably will occur in humans as well. Thus, extrapolation to humans should be more reliable. However, if the lethal dosage is found to vary considerably in a number of different species, extrapolation to humans becomes tenuous. Such an observation indicates that the toxicity is species-related and that further investigations are needed to determine which species resembles the human. Thus, the determination of lethal potency in several species can have a marked influence on the confidence with which extrapolation to the human exposure situation is carried out. Furthermore, such results can have an important influence on the kinds of additional toxicological or biological studies that might be required to resolve the issue. Thus, it would seem unwise to restrict a priori the number of species that should be tested in lethality studies.

Important information can al[illegible]e obtained from lethality studies performed with different routes of administration. In the past, such observations have had an important bearing on conclusions regarding the relative bioavailability (amount absorbed) of various chemicals following exposure by different routes of administration. They have been essential for determining how chemicals can be handled safely. These data can also help to establish the exposure conditions that are relatively without risk when chemicals are to be used as articles of commerce. Thus, it would be unwise to limit a priori the routes of administration that should be employed in lethality studies.

Whether to employ a particular lethality test or not, or the precision one needs if the test is chosen, depends on the anticipated use that will be made of the data generated. This means that one must look at the toxicological questions that are being asked. Estimates of acute lethal potency are presently very important data for the classification of chemicals when these substances are transported as hazardous chemicals. In the case of accidental spills and derailments, for instance, the adverse effects of consequence to humans are those associated with the temporary acute exposure to high concentrations of the chemical. In the occupational setting, accidental discharges may occur, resulting in acute exposures to potentially unsafe amounts. Acquisition of sound LD50 data are essential in such situations.

It is important to point out that there are no known, validated alternatives to the use of animals for the assessment of lethal potency. Nor are such alternatives likely to appear in the near future. Attempts are being made to develop techniques that predict lethal properties of certain classes of chemicals on the basis of already known structure-activity relationships. Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) and Quantitative Structure-Toxicity Relationships (QSTR) are examples of such approaches. The reliability of the QSAR approach depends on the availability of data reflecting (1) well-defined interactions between chemical substances (2) belonging to congeneric series of structures and (3) an already known active site in a biological system. The application of the QSAR approach is said to

presuppose the presence of an active site coupled with unambiguousness (in terms of mechanism of action) of the observed biological effects. The present state of toxicological knowledge is far from providing the necessary data that could make use of the QSAR approach. Thus, while these efforts are to be encouraged, it is evident that they will not be reliable substitutes for experiments in laboratory animals.

There is an important political issues that also bears on the safety evaluation process. Toxicological assessments are used to protect the public from the potentially adverse effects of chemicals. Public perception is that individuals have the right to live in a so-called "safe" environment. The adversarial-litigation climate that reigns in North America reflects this public perception. This climate indirectly influences the practice of toxicology. What toxicologist or government regulator is likely to decide in favour of not performing a particular toxicological study, thought to be of limited value, when court litigation at some later date for this decision remains a possibility?

Conclusions:

The position of the Society of Toxicology of Canada on the issue of the so-called "LD50 test" can be summarized as the following:

1. The assessment of the lethal properties of chemicals is an essential component of toxicological evaluations designed to protect the public and the environment.

2. Sound toxicological questions should determine the extent to which the evaluation of lethality should be pursued. The number of species tested, the range of dosages employed, and the number of routes investigated should be minimized but consistent with sound toxicological approaches.

3. In most instances, high statistical precision of the LD50 estimate does not appear to be essential. Consequently, procedures that permit the estimation of this parameter with a small number of animals should be the procedures of choice.

4. All efforts should be carried out for the worldwide dissemination and communication of such results to prevent the unnecessary repetition of such studies.

5. Toxicologists should contribute to the construction of biological data banks that may lead to the development of non-animal approaches to the estimation of lethal potency.

APPENDIX 3
CONFLICTING INDICATIONS IN CANADA*

According to the Canadian Council on Animal Care's "Resource" (12 (1), 4, 1987), the Canadian Minister of National Health and welfare has said that, while few LD50 tests are conducted in Canada, determination of an LD50 is "an important step in the acute toxicity assessment of any new substances to which humans be exposed". Other opinion, of Dr. Keith Bailey, Health and Welfare Canada, is that the "LD50 is out of favour", and, in the Society of Toxicology of Canada, is that "in most instances, the high statistical precision of the LD50 estimate does not appear to be essential. Consequently, procedures that permit the estimation of this parameter with a small number of animals should be the procedure of choice".

The view of the Minister, the Hon. Jake Epp, appears to have prevailed, to the dismay of drug companies in other countries who wish to sell their products in Canada. The Canadian regulatory bodies are already considered to be reactionary, but new draft preclinical toxicologic guidelines, produced in September 1987 by the Bureau of Human Prescription Drugs, Health Protection Branch, Health and Welfare Canada, appears to be likely to make a bad situation even worse.

The draft guidelines require acute toxicity studies in both sexes of at least three species (2 rodent, 1 non-rodent other than the rabbit), with at least 10 animals per sex per dose and at least three doses other than the LD50 and LD100 in all the rodent tests; an approximate determination of the LD50 or, if necessary, the MLD, will suffice in the non-rodent species, although both sexes should nevertheless be used. If substantial difference, either quantitative or qualitative, are observed, additional species should be used.

Perhaps members of HWC and STC could advise non-Canadian toxicologists of the thinking behind these proposals, which are counter to the general trend of greater rationalisation.

Source: ATLA 15, 180, 1988

*The directive of November 15, 1989, from the ADM-HPB cited in full on p. 36 of this report would seem to have corrected this problem so that these and other adverse criticisms of Canadian acute toxicity testing requirements are no longer applicable.

Appendix 4

Alternative In vitro Methods

(From "Eye Irritation Testing", ECETOC Monograph No. 11, 1988)

3.1: Cell Cultures (Cytotoxicity Tests)

Test Object	Testing Procedure and Evaluation	Tested Substances	Correlation to in vivo data (Draize Test rabbit eye)
Human hepatoma cells (Hep G2) Murine Fibroblasts (BALB/c 3T3), Chinese hamster lung fibroblasts (V 79), Murine macrophage cultures. Epithelial rabbit cornea cells	1) Pre-incubation 24 h 2) Treatment with test-compound and incubation for 24 h 3) Cells in new normal medium were allowed to replicate for 7 days to form colonies 4) Cultures fixed, stained and colonies counted 5) Results are expressed as per cent colony formation of untreated controls	Alcohols, ethers, esters, ketones, acids, amides, detergents, benzalkonium chloride, benzethonium chloride Tween (34 substances)	The highest tolerated dosages determined for each test compound were ranked to each other and to published rabbit ocular irritancy data. "Good agreement between all 5 methods" and "well in ranking" to ocular irritancy Borenfreund and Borrero (1984)
BALB/c 3T3 mouse fibroblast cells	1) Pre-incubation 24 h 2) Treatment with test compound and incubation for 24 h 3a) Scoring morphologically for cytotoxic effects 3b) Determination of Neutral Red uptake spectrophotometrically	Benzalkonium chloride, penzethonium chloride, Triton X-155, sodium lauryl sulfate. Tween 60, TEA-laurylsulfat (6 substances)	The observed ranking in both evaluations (cytotoxic effects and Neutral Red uptake) are in "agreement" with in vivo (Draize test) observations Borenfreund and Puerner (1985)
Cells from the corneas of normal rabbit eyes (SIRC rabbit corneal cells)	Reduction of cloning efficiency 1) 400 cells pre-incubation 18 h 2) Treatment for 1 h with test substances in different concentration 3) Incubation for 7 days to form colonies before determining the mean percent survival in relation to negative controls and LC50	13 surfactants (5 cationics, 3 anionics, 2 amphotenics, 3 nonionics) 6 shampoos	Rank correlation analysis indicated a correlation coefficient of 0.90 North-Root et al. (1982) North-Root et al. (1983) 100% agreement North-Root et al. (1985)

Appendix 4

3.1: Cell Cultures (Cell Detachment, Growth Inhibition and Cloning Efficiency Test)

Test Object	Testing Procedure and Evaluation	Tested Substances	Correlation to in vivo data (Draize Test rabbit eye)
1. Baby hamster kidney fibroblasts (8HK-21/C13) 2. Early (Keller) and late (MRC-5) passage human fibro-blasts	3 parameters measured 1. Cell detachment assay 24 h pre-incubation 4 h exposure to the test substance 2. Growth inhibition 24 h pre-incubation 48 h exposure to the test substance. Cells counted before and after incubation. 3. Cloning efficiency 7 days exposure to the test substance Cells fixed and stained with Giemsa Cell detachment assay and cloning efficiency number of colonies expressed as percentage of control (IC50)	57 chemicals of various classes (inorganic and organic metal salts, solvents, detergents, reagents, drugs)	The ranking order resulting from in vitro data correlated better with threshold limit values for human workroom air (TLV/TWA) than with LD50-values (rat. oral). Correlation with data from Draize skin and eye irritation tests were not determined since the available in vivo values were derived using various different scoring systems. But the in vitro data were more than 80% preditive of in vivo classification (skin and eye irritation) when used to divide the chemicals into three crude classes (non, mild to moderate, strong irritant or corrosive) Reinhardt et al. (1985)
		3 endogenous chemicals (glutathione, 1-methionine, 1-cysteine HC1) and 4 organo tin compounds	Correlation was not calculated, no in vivo data available, but both assays rank all compounds tested in the same sequence of toxicity as that known from in vivo studies Reinhardt et al. (1982)

Appendix 4

3.1: Cell Cultures (Neutral Red Uptake, 51Cr-Release Test)

Test Object	Testing Procedure and Evaluation	Tested Substances	Correlation to in vivo data (Draize Test rabbit eye)
BALB/c-3T3 cells (mouse fibroblasts)	Uptake of Neutral Red (NR) as a measure of the toxic effects of substances 1) Pre-incubation 24 h 2) Test samples added to the semi-confluent cultures incubation time 24 h 3) Test samples removed after 3 h incubation 4) Determination of uptake of NR NR concentration in extraction medium is determined spectrophotometrically, result expressed as a percentage of the control values	Benzalkonium chloride, benzethonium chloride, Triton X-155, sodium lauryl sulfate, Tween 60, TEA-laurylsulfate (6 substances) Different chemicals, alcohols, surfactants and others (35 substances) 9 test compounds (different chemical substances with eye irritancy classification from none, mild, moderate to severe)	Neutral Red uptake in agreement with in vivo (Draize-Test) observations Borenfreund and Puerner (1985) When used as screening test reasonable correlation depending on the class of chemical tested Kunstler et al. (1986-b) NR-uptake and eye irritancy (Draize-Test) showed "a good agreement" Hockley and Baxter (1986)
Primary corneal epithelial cell cultures from rabbits SIRC-cells, YAC-cells, P 815-cells tumour cell line P 815, YAC-1, SIRC-cells	1) Cells radiolabelled with ^{51}Cr for 2h 2) Exposure of radiolabelled cells to serial two fold dilutions of test material for 4 h 3) Centrifugation of the microtitre plates 4) Determination of the ^{51}Cr in the supernatants with a gamma counter CD50 represents the concentration of test material which caused release of 50% of radiolabelled cells	5 surfactants (benzalkonium chloride, 2-alkyletho-xylated sulfates, sodium dodecyl sulfate, coconut soap, Polysorbate 20)	"Nice correlation between in vitro and in vivo data Shadduck et al. (1985-a)

Appendix 4

3.1: Cell Cultures (Cytotoxicity Test, Cell Membrane Assay)

Test Object	Testing Procedure and Evaluation	Tested Substances	Correlation to in vivo data (Draize Test rabbit eye)
Human epithelioid cell lines (Hela and HEp2)	Cell-membrane integrity assessed by using fluorescein diacetate/ethidium bromide. Loss of this fluorochromasia correlated with other indicators of cell damage	12 surfactants	Variable correlation with in vivo data for anionic and cationic surfactants Scaife (1982)
	Assessment of cell-membrane integrity by measurement of the release of alkaline phosphatase. Data assessed by determination of EC50 values.	4 surfactants	"Good correlation" between in vitro data and rabbit eye irritation data Scaife (1985)
Mouse LS-cells derived from NCTC L 925 mouse fibroblasts	50% cell death (CD50) after exposure to test samples for 4 h	11 detergent-based commercial products	With one exception, reasonable correlation between in vivo and in vitro data Kemp et al. (1983)

Appendix 4

3.1: Cell Cultures (Protein Cell Growth Assay, Uridine Uptake Assay)

Test Object	Testing Procedure and Evaluation	Tested Substances	Correlation to in vivo data (Draize Test rabbit eye)
Mouse fibroblasts BALB/c-3T3-cells and other cells	Inhibition of protein production after incubation with the test substances is measured 24 h incubation in growth medium together with medium containing test materials in various concentrations	25 chemicals (alcohols, ethers, esters, ketones, amids, acids, detergents)	Ranking correlated well with published data of Draize test Shopsis and Sathe (1984)
		19 chemicals (alcohols, etc.), 17 surfactants	Cytotoxic morphological changes correlate "very well" with ocular irritancy Shopsis et al. (1985)
	1) Cell toxicity assessed by phase contrast microscopy 2) Cell protein determined by rapid semi-automated method with the Bio-Rad dye reagent 3) Results: ug protein/well expressed as percentage of the cell protein in untreated cells	9 alcohols	Good agreement with the relative irritancies in Draize rabbit eye test results Borenfreund et al. (1983)
		39 substances (chemicals, anti-microbiol agents, cosmetics)	Bad correlation, cell cultures are too sensitive Triemer et al. (1986)
BALB/c 3T3-cells and other cells	Inhibition of uridine uptake is measured. 1) Cells exposed to various concentrations of test samples for 4 h 2) ^{3}-H-uridine uptake determined over subsequent 15 minute period Toxicity assessed as the concentrations of test material (ug/ml) required for 20%, 50% and 80% inhibition.	25 chemicals (alchols, ethers, esters, ketones, amids, acids, detergents) 19 chemicals (alcohols, etc.) 17 surfactants	Ranking correlated well with published data of Draize test Shopsis and Sathe (1984) Uridine uptake inhibition correlated well with Draize data when the two groups are evaluated separately Shopsis et al. (1985)
		9 alcohols	Good agreement with in vivo results Borenfreund et al. (1983)
		14 different chemicals, alcohols, surfactants	Used as screening test. More or less good correlation depending on the chemical class of tested substances Kunstler et al. (1986-a)

Appendix 4

3.2: Organs and Organ Cultures (Enucleated Rabbit Eyes, Isolated Rabbit Cornea)

Test Object	Testing Procedure and Evaluation	Tested Substances	Correlation to in vivo data (Draize Test rabbit eye)
Enucleated rabbit eyes maintained in saline perfusion chambers	1) Corneal thickness is determined with a slit lamp biomicroscope fitted with depth measuring attachment 2) Solid samples (50 mg) are placed on the corneal surface. Liquids are applied on the upper margin of the cornea. 3) Contact time ranged from 10 sec to 5 min	11 substances (sodium hydroxide, acetic anhydride, formaldehyde, allyl alcohol, n-butanol, ethanol, acetone, QAV, toluene, propylene, glycol, glycerine)	Results of in vitro tests "correlated broadly" with own in vivo data and data recorded in the literature Burton et al. (1981)
	4) Corneal swelling, gross corneal changes and histological integrity of epithelium evaluated up to 4 h after treatment	11 substances and 1 shampoo (100 and 10%) 10, 30 sec., 2 and 5 min contact time	"Reasonable" correlation between in vitro and in vivo results York et al. (1982)
		60 chemicals (25 industrial chemicals, 18 formulated agro-chemicals, 3 unformulated agrochemicals, 14 formulated lubricating oils)	The rapidity and degree of corneal swelling were related to in vivo irritancy potential Price and Andrews (1985)
		39 substances (solvents like acetone, ethanol, alcohols, other substances)	Correlation betweenn in vitro and in vivo results for 32% of all substances Koeter and Prinsen (1985)
Isolated rabbit cornea	Changes in the electrical impedance across the isolated cornea were measured in the presence and absence of various anionic detergents	6 anionic surfactants	The rate of change of impedance decreased with an increase in alkyl chain length for sodium alkyl sulphates. Results correlated with in vivo ocular irritation test results Scaife (1985)

Appendix 4

3.2: Organs and Organ Cultures (Corneal Opacity, Rabbit Isolated Ileum)

Test Object	Testing Procedure and Evaluation	Tested Substances	Correlation To in vivo data (Draize Test rabbit eye)
Bovine cornea	1) Cornea bathed in Tyrode solution with or without test substance at 32 degrees Celsius 2) Measurement of corneal thickness or opacity with a special slit lamp or opacitometer 3) Concentration effect curves are drawn	Tetracaine, benoxinate, benzalkonium chloride, sodium decyl sulfate, sodium lauryl sulfate	No in vivo data available Andermann and Erhart (1983)
			No comparison Muir (1984-a)
		8 surfactants and 5 industrial chemicals	Corneal in vitro data correlated well with published in vivo data Muir (1985)
		Several concentrations of sodium lauryl sulfate	Opacity increased with increasing concentrations of NaLS Haruyoshi Igarashi (1986)
Isolated rabbit ileum	Influence of test substance of spontaneous concentrations of isolated ileum 1) Ileum set up under standard conditions in an organ bath 2) Spontaneous contractions are recorded using an oscillograph 3) Chemicals added cumulatively at 10 min intervals 4) Toxicity (EC50) assessed as the concentration which blocks 50% of spontaneous activity	8 surfactants	Good correlation between EC50 and in vivo data Muir et al. (1983)
		4 anti-dandruff shampoos, 4 adult shampoos, 4 baby shampoos	Correlation with in vivo data Muir (1983-a)
		12 substances (alcohols, aldehydes, etc.)	EC 50-values correlate with in vivo irritancy data Muir (1983-b)
		6 surfactants (3 sulphates, 3 bromides)	Good correlation with in vivo data Muir (1984-b)
		5 anti-dandruff, 7 adult, 11 baby shampoos	EC50 for anti-dandruff and adult shampoos "correlated well" with ocular irritancy for 20% dilution, but correlation was poor for baby shampoos Muir et al. (1986)

Appendix 4

3.3: Hen's Egg Chorioallantoic Membrane (CAM) (HET-CAM-Assay or Chorioallantoic Membrane Test)

Test Object	Testing Procedure and Evaluation	Tested Substances	Correlation to in vivo data (Draize Test rabbit eye)
Fertilized hen's egg	1) Dilutions of test substances applied to CAM of 14-day hatched hen's eggs 2) Necrotic areas measured after 48-72 h and lesions described 3) Data evaluated on size and nature of lesions with thresholds for "positive" reactions	12 household preparations 9 chemicals with known eye irritancy potential in vivo selected from published data	Ranking correlation coefficient r = 0.72 Leighton et al. (1985) For 4 of the 9 chemicals, the response in the CAM was considered to predict the in vivo activity. The CAM-test is not suitable for predicting in vivo irritant potential of substances for the conjunctiva. Others do nnot consider it to be a relevant predictive method of irritation. Lawrence et al. (1986)
	1) 0.2 ml of test substances applied to the CAM on day 10 of incubation 2) 72 hours later, nature of lesions assessed (surface, blood vessels, colour)	39 substances (chemicals, surfactants, antimicrobial agents, cosmetics) with known irritancy potential from harmless to severe	CAM-test is more sensitive than rabbit eye. Good correlation for slight or strong irritants. Correlation is less good for moderate irritants. Triemer et al. (1986)
	1) 0.1 ml of test material is applied to the membrane on day 12 2) The degree of injection and haemorrhage of blood vessels is scored at 0.5, 2, 5 and 10 min.	30 chemicals (industrial chemicals, oils, formulated pesticides)	23 chemicals were correctly identified as irritant or non-irritant; five false positives and two false negatives. Ranking of intensity of CAM response did not correlate with the severity of in vivo effects. Price et al. (1986)

Appendix 4

3.3: Hen's Egg Chorioallantoic Membrane (CAM)
(HET-CAM-Assay or Chorioallantoic Membrane Test)

Test Object	Testing Procedure and Evaluation	Tested Substances	Correlation To In vivo Data (Draize Test rabbit eye)
Embryonated Chicken Eggs	1) 0.2 ml or 0.1 g test substance applied onto the CAM on day 10. Solids rinsed after 20 sec 2) 0.5, 2 and 5 min after treatment blood vessels assessment of irritant effects (hyperaemia, haemorrhage, coagulation)	3 vehicles, 7 antimicrobial agents, 11 oxidation dyes and 8 commercial shampoos	"Good correlation" between CAM irritation and Draize test results for all tested classes of compounds Lupke (1985-a, b)
		About 190 substances and formulations	"Good correlation" Lupke (1986) "High reproducibility" in HET-CAM-tests between different investigators and laboratories Lupke and Kemper (1986)
	1) 300 ul of test material applied to CAM on day 10 2) Reactions assessed continuously for 5 min after application	13 chemicals (alcohols, surfactants, and others)	The results of HET-CAM-Test are in "good accordance" with results from in vivo studies Kunstler et al. (1986-b)
Embryonated Chicken Eggs	1) On day four 1.5 - 2 ml of albumin are withdrawn to create an enlarged airspace for development a CAM 2) On day 14, a teflon ring is placed on the CAM and the test material is placed into the inner area of the ring. 3) On day 17 of incubation, the lesion size of the CAM is evaluated.	42 test substances of diverse nature (water soluble, lipophilic and particulate materials)	31 of the 42 samples were eye irritants as well in vivo as in vitro tests. 8 were false positive in CAM assay, 3 were negative in both (rabbit eye assay and CAM assay) Kong (1987)

Appendix 4

3.4: Other Procedures (Petrahymena Test and Erythrocyte Haemolysis Test)

Test Object	Testing Procedure and Evaluation	Tested Substances	Correlation to in vivo Data (Draize Test rabbit eye)
Tetrahyma thermophila	Inhibition of mobility of a protozoa 1) Test samples are diluted in filtered MM2 medium and added in equal volume to the Tetrahyma suspension 2) Normal mobility pattern of the organisms is quantified 3) End-point is the highest tolerated dose (HTI) allowing at least 90% of cells to retain normal mobility	8 alcohols, 6 ethers, 2 ketones, 3 acids, 4 bases, 5 salts, formaldehyde, dimethyl sulfoxide	In 58% of tests, results were the same as literature reports of in vivo testing. More severe reaction with T. thermophila in 27% of the tests and a less severe reaction in 15% of the tests. Silverman (1983)
Bovine and rabbit erythrocytes	Dose response curves were constructed for each surfactant enabling calculation of the concentration required to produce 50% haemolysis (EC50-haemolysis)	8 anionic surfactants, 4 cationic surfactants	Haemolytic potency in vitro "failed to correlate" with in vivo rabbit eye irritancy Muir et al. (1983)
		16 anionic surfactants	No correlation Kastner and Frosch (1981)

APPENDIX 5

AUCC STATEMENT ON THE USE OF ANIMALS IN RESEARCH AND TESTING

Dear Dr. Gilman

In response to your letter of February 20 addressed to Rosemary Cavan, AUCC Director of Communications, am pleased to confirm AUCC's position as follows:

> "The AUCC, representing 88 universities and degree granting colleges, recognizes the necessity of using laboratory animals in research and testing. The AUCC also supports the ongoing efforts throughout the scientific community to minimize that use through the development of appropriate in vitro and other procedures where these may provide equal or higher standards of scientific achievement/usefulness and economic benefits to research or safety assessment enterprises. To these ends, AUCC has actively participated in the Canadian Council on Animal Care since its inception in 1969 and endorses the CCAC mandate which includes encouragement of the use of procedures that minimize the utilization of animals wherever these are scientifically appropriate."

You are welcome to use this statement in your report to the Drugs Directorate, Health Protection Branch, Health and Welfare Canada.

Sincerely

Claude Lajeunesse
Executive Director

APPENDIX 6

PROPOSED UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN POSITION ON LD50 AND DRAIZE EYE IRRITANCY TESTING

General

The University Committee on Animal Care and Supply (UCACS) accepts that toxicity testing using animals is a necessary part of some research programs, and of the safety evaluation of new drugs, compounds and chemicals. However, it is the view of the Committee that wherever possible, non-animal alternative test systems should be used to obtain the information required. The UCACS, therefore, encourages researchers to become engaged in research aimed at validation of alternative methods, which may convince regulatory agencies that LD50 or Draize Eye Irritancy testing is no longer needed.

When LD50 and Draize Eye Irritancy testing using animals is part of a University of Saskatchewan research program, it will be regarded as acceptable for consideration by the animal care committee in the same manner that other teaching and research uses of animals are accepted and reviewed. However, preliminary screening for acute toxicity using molecular predictors and/or non-animal tests should be done prior to the use of live animals for these purposes.

The UCACS is not prepared to accept submissions proposing to perform only LD5O or Draize Eye Irritancy testing on a contract basis for external agencies, without such tests being a component of a general toxicity testing program to be done at the University of Saskatchewan. LD50 and Draize Eye Irritancy testing will be acceptable only when a regulatory agency indicates that these tests are mandatory (see procedures).

Procedures for Protocol Approval

Protocols involving LD50 and Draize Eye Irritancy testing as part of an in-house University of Saskatchewan research project will be reviewed according to normal review procedures.

Before a protocol that includes LD50 and Draize Eye Irritancy testing as part of safety evaluation for regulatory purposes can be accepted by the UCACS, there must be a written indication from the regulatory agency (e.g., Health Protection Branch or Agriculture Canada, etc.) that the tests in question are a necessary part of the submission for licensing/approval. Both the regulatory agency and the investigator must demonstrate to the Committee that an alternative *in vitro* test is not acceptable, and the reasons will be stated in writing.

Acceptable Testing Standards

Whenever such toxicity tests are done, they must be done according to established guidelines, such as the Guidelines of the OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), or according to Health and Welfare Canada or US

Federal Drug Administration regulations, using the minimum number of animals possible, and with all possible consideration for the relief of animal pain and suffering.

When LD50 testing must be done, maximal information should be retrieved (e.g., complete *post mortem* examinations, etc.) so that the benefit per animal used for acute toxicity testing is maximal.

Minimizing Pain and Suffering

Endpoints earlier than the death of the animal should be used whenever possible. Animals found *in extremis* should be humanely killed.

As a general policy, investigators should use test procedures that use the fewest animals, or that have a lower ethical cost for the animals, and are encouraged to develop, validate and use alternative methods.

Santé et Bien-être social Canada
Health and Welfare Canada

Canada

RAPPORT SUR L'ÉTAT ET LES TENDANCES

de la
TOXICOLOGIE IN VITRO

et
MODIFICATIONS DES MÉTHODOLOGIES

pour
RÉDUIRE L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE

préparé par:
J.P.W. Gilman, D.M.V.
Professeur émérite
Sciences biomédicales
Université de Guelph

Directeur exécutif
The Joseph F. Morgan Research Foundation
Ottawa (Ontario)

Santé et Bien-être social Canada
février 1990

DD-90-11

Le présent rapport a été préparé en vertu du contrat #1985 pour la Division de la toxicologie des médicaments, Bureau de recherche sur les médicaments, Direction générale de la protection de la santé, Santé et Bien-être social Canada. Mai 1989. Révision et mise à jour en janvier 1990.

Les opinions exprimées dans le présent document sont celles de l'auteur et ne reflètent pas forcément les opinions du ministère.

Rapport sur l'état et les tendances de la toxicologie *in vitro* et modifications des méthodologies pour réduire l'expérimentation animale

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada
1990
Cat. H42-2/42-1990
ISBN 0-662-57744-2

AVANT-PROPOS

La Division de la toxicologie des médicaments du Bureau de recherche sur les médicaments, Direction générale de la protection de la santé (DGPS), Santé et Bien-être social Canada, a commandé le présent rapport en décembre 1988 afin de le soumettre à la révision interne pour la mi-mai 1989. Par la suite, c'est l'auteur même du rapport qui en a rédigé les versions revues et les mises à jour à la lumière des révisions internes.

Le rapport ne se veut ni ne doit être considéré comme une tentative de traiter en détail ou de porter un jugement sur les avantages relatifs de certains protocoles expérimentaux ou d'autres stratégies expérimentales. Il a cependant été conçu dans le but d'approfondir dans une certaine mesure les connaissances actuelles sur la toxicologie *in vitro* et les autres tendances se rapportant aux méthodes toxicologiques de substitution et susceptibles d'entraîner une diminution du nombre d'animaux utilisés à ces fins, tant au niveau national qu'à l'échelle internationale.

Tout au long du rapport, l'accent porte sur les aspects des méthodes de substitution (telles qu'elles sont définies) qui sont considérés comme étant d'une pertinence particulière dans le domaine de la toxicologie des produits pharmaceutiques et biologiques. Toutefois, il est aussi question, de façon moins détaillée, des tests toxicologiques effectués sur les produits chimiques de consommation, les produits chimiques destinés à l'agriculture, de même que les aliments. Notre attention s'est portée en particulier sur les cas où des méthodes innovatrices applicables aux médicaments ont été mises au point et ont fait l'objet d'utilisation expérimentale, de validation ou d'acceptation (ou les deux) à d'autres fins. L'évaluation toxicologique et les critères d'évaluation des risques sont évidemment plus sévères pour les médicaments et les produits biologiques que pour les produits chimiques de consommation et les cosmétiques. Toutefois, les principes de base sont les mêmes et il devient de plus en plus pressant d'appliquer l'évaluation toxicologique à la protection de l'environnement.

La revue de la recherche et du développement somme toute assez restreints qui sont effectués au Canada dans le domaine de l'évaluation toxicologique a porté davantage sur ce qui se fait au sein de la DGPS, particulièrement à la Direction des médicaments. Cependant, il s'avère également qu'à l'exception des cas mentionnés dans le présent rapport, le Canada effectue à l'heure actuelle très peu de recherche et de développement sur l'évaluation toxicologique, particulièrement en toxicologie *in vitro* et en recherche et validation de modifications aux méthodes.

L'un des objectifs du rapport est d'attirer l'attention sur la performance relativement piètre des organismes gouvernementaux et de l'industrie au Canada lorsqu'il s'agit d'encourager et de fournir l'effort financier dans ce domaine de développement technologique d'une importance sans cesse croissante. Cette carence est particulièrement visible si l'on considère ce qui se fait aux États-Unis ou en Europe.

Remerciements : L'auteur tient à exprimer toute sa gratitude à Mme Frances Rodenburg pour son aide de tous les instants dans la préparation du manuscrit, ainsi qu'à la Fédération canadienne des sociétés humanitaires pour lui avoir gracieusement permis l'accès à des systèmes informatiques et à d'autres ressources.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS i

TABLE DES MATIÈRES ii

DÉFINITIONS v

RAPPORT SOMMAIRE 1

1.0 INTRODUCTION 5

2.0 LES TESTS TOXICOLOGIQUES 6
- 2.1 La base et les applications 6
- 2.2 L'impasse des produits chimiques 7
- 2.3 La pertinence des données toxicologiques disponibles 7

3.0 L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE : commentaires et problèmes 11
- 3.1 Le coût des essais (temps et argent) 11
- 3.2 Évaluation des données moins satisfaisantes 12
- 3.3 Considérations d'ordre moral 12
- 3.4 La fiabilité des essais sur les rongeurs 13

4.0 LES TESTS DE SUBSTITUTION : commentaires et problèmes 15
- 4.1 Influence des groupes de protection des animaux 15
- 4.2 Le financement 15
- 4.3 Résultats faussement positifs des essais à court terme 17
- 4.4 Évaluation de la génotoxicité 17
- 4.5 La validation 19
- 4.6 L'acceptation réglementaire 20

5.0 TOXICITÉ AIGUË 23
- 5.1 Le test de la dose létale moyenne (DL50) 23
- 5.2 Classification des substances toxiques 25
- 5.3 Tendances actuelles en matière de réglementation 27
  - 5.3.1 Recommandations de mise à jour des lignes directrices de l'OCDE (1987); propositions (1989-1990) 27
  - 5.3.2 La Communauté économique européenne 28
  - 5.3.3 La position de l'industrie européenne 30
  - 5.3.4 Les initiatives japonaises 30
  - 5.3.5 Progrès accomplis aux États-Unis (EPA et FDA) 31

6.0 LES TESTS SUR LES EFFETS IRRITANTS POUR LA PEAU ET LES YEUX 33
- 6.1 Le test de Draize 33
- 6.2 Une perspective de l'industrie - Europe 33
- 6.3 Progrès récents - États-Unis 35
  - 6.3.1 Les centres d'étude de méthodes substitutives 36
  - 6.3.2 Le rôle des associations d'industries 36

7.0 TOXICITÉ AIGUË : PERSPECTIVE CANADIENNE 40
7.1 La Direction générale de la protection de la santé 40
7.2 Les exigences et les lignes directrices relatives aux tests (DL50) 40
7.2.1 Médicaments 40
7.2.2 Aliments 42
7.2.3 Produits chimiques destinés à l'agriculture; protection de l'environnement 42
7.3 Les effets irritants pour la peau et les yeux 44
7.3.1 Règlements 44
7.3.2 Responsabilités de l'industrie 44
7.3.3 «Cosmétiques sans cruauté»? 45
7.3.4 Recherche 45

8.0 LES TESTS À DOSES RÉPÉTÉES 47
8.1 Les tests de toxicité subaiguë 47
8.2 Les études de toxicité sub-chronique 48
8.3 Les tests des effets toxicologiques sur la reproduction 49
8.4 Les exigences réglementaires canadiennes 50

9.0 TOXICITÉ CHRONIQUE ET CANCÉROGÉNICITÉ 51
9.1 Les tests à long terme 51
9.1.1 L'évaluation des risques 51
9.1.2 Les essais biologiques sur les rongeurs 51
9.2 Les tests à court terme 53
9.2.1 Génotoxicité 53
9.2.2 Les relations entre la structure et l'activité 55
9.2.3 Les banques de données informatisées 55
9.2.4 Les produits cancérigènes non génotoxiques 56
9.3 Quelques positions de principe et points de vue sur les politiques 56
9.3.1 Le Japon 56
9.3.2 Les États-Unis : EPA et FDA 57
9.3.3 Quelques points de vue et commentaires NIEHS/NTP 58

10.0 LES ORIENTATIONS EN EUROPE 60
10.1 La recherche toxicologique *in vitro* 60
10.1.1 Les concepts 60
10.1.2 Les progrès récents 60
10.2 Les instituts de recherche européens 61
10.2.1 La France 61
10.2.2 La Suisse 64
10.2.3 L'Allemagne de l'Ouest 66
10.2.4 La collaboration à la réglementation 67
10.3 Autres initiatives européennes 68
10.3.1 Les activités des associations industrielles 68
10.3.2 Les banques de données 69
10.3.3 Les études d'évaluation et l'aide à la recherche 70

11.0 LES ACTIVITÉS AU CANADA 72
11.1 Les laboratoires de la Direction générale de la protection de la santé 72
11.1.1 Le Bureau des produits biologiques 72
11.1.2 Le Bureau de recherche sur les médicaments 73
11.1.3 La Direction de l'hygiène du milieu 75
11.1.4 La Direction des aliments 76
11.2 Les laboratoires d'hygiène vétérinaire 77
11.3 Les centres toxicologiques universitaires 77
11.4 Autres programmes universitaires 78
11.5 Les subventions de recherche 79
11.6 Un modèle pour de collaboration 80
11.7 L'harmonisation des règlements et des lignes directrices 81

BIBLIOGRAPHIE 83

ANNEXE I 90
Étude de collaboration internationale
Tests de toxicité orale aiguë de substances et préparations
ANNEXE 2 100
Société de toxicologie du Canada: Exposé critique sur la DL50
ANNEXE 3 105
Signes contradictoires au Canada, ATLA 15
ANNEXE 4 106
Autres méthodes *in vitro*, Monographie ECETOC n° 11
ANNEXE 5 116
Déclaration de l'AUCC sur l'utilisation d'animaux pour la recherche et pour les tests
ANNEXE 6 117
Position recommandée de l'Université de la Saskatchewan en ce qui concerne la DL50 et les tests de Draize sur les effets irritants pour les yeux

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAU I - Tableau comparatif des méthodes d'essai *in vivo* et *in vitro* 1
FIGURE 1 - Pertinence des données toxicologiques disponibles 9
TABLEAU II - Pourcentages estimés de substances 10
TABLEAU III - Insuffisances de la DL50 24
TABLEAU IV - Critères de classification des substances chimiques toxiques 26
TABLEAU V - Déclaration de la Commission sur la DL50 et la classification des produits à traduire 29
FIGURE 2 - Exemple d'une méthode de test progressive pour déterminer l'irritation oculaire 34
TABLEAU VI - Essai du faible volume 38
TABLEAU VII - Résumé de l'atelier mixte gouvernement-industrie 39

DÉFINITIONS

Les définitions suivantes seront utilisées aux fins du présent rapport :

ANIMAUX - Comprend tous les animaux, à l'exclusion des protozoaires unicellulaires et des primates hominiens. Pour les besoins du présent rapport, les animaux sont à leur tour subdivisés en :

a) animaux invertébrés : toutes les classes d'animaux non vertébrés, sauf les protozoaires;
b) animaux à sang froid : reptiles, amphibies et poissons;
c) animaux à sang chaud : tous les oiseaux et les mammifères non hominiens, incluant leurs formes fœtales, à partir du milieu du développement de l'incubation ou de la gestation.

Ces divisions arbitraires ont été faites en considérant l'utilisation actuelle d'animaux moins avancés sur le plan évolutif et de formes embryonnaires aviaires et mammifères comme remplacements de mammifères dans certains essais toxicologiques.

BIODISPONIBILITÉ - Degré auquel un médicament ou une autre substance devient disponible au niveau du tissu cible après administration.

BIOTRANSFORMATION - Série de modifications chimiques d'un produit (médicament) qui a lieu dans l'organisme, notamment grâce aux enzymes.

CANCÉROGÉNÈSE - Production de cancer.

EXCIPIENT - Toute substance plus ou moins inerte ajoutée à une formulation pour lui donner la forme ou la consistance voulue - un véhicule.

MÉTHODES SUBSTITUTIVES - Tout sujet, protocole ou technologie qui remplace entièrement l'utilisation d'animaux de laboratoire, réduit le nombre d'animaux utilisés ou améliore les techniques ou procédures existantes de manière à diminuer le niveau de stress que doit subir l'animal.

Cette définition est donnée dans le *US Office of Technology Assessment Report on Alternatives to Animal Use in Research, Testing and Education* (OTA 1986a).

MICRONOYAU - Petit noyau, petite portion de matériel nucléaire située à l'extérieur de la membrane du corps nucléaire principal (macronoyau).

MICRO-ORGANISMES - Se rapporte en bloc à tous les protozoaires, algues, moisissures, levures, bactéries et virus.

MICROSOME - Vésicule formée à partir du réticulum endoplasmique après lyse cellulaire et centrifugation de l'homogénat.

MUTAGÉNÈSE - Induction d'une mutation génétique.

MUTATION - • génétique : modification permanente transmissible faite au matériel génétique (soit la modification d'un seul gène au niveau moléculaire, l'échange [transduction], la perte [délétion] ou l'addition [translocation] de matériel génétique).

• somatique : mutation qui a lieu dans une cellule somatique, par opposition à une mutation qui a lieu dans une cellule germinale, et qui n'est donc transmissible qu'à ses cellules filles. La base d'une mosaïque.

PARENTÉRALE - Voie d'administration par injection; il ne s'agit ni de la voie alimentaire ni d'une application externe (topique).

PHARMACOCINÉTIQUE - Action d'un médicament dans l'organisme pendant un certain intervalle de temps, englobant les processus d'absorption, de distribution, de localisation dans les tissus, de biotransformation et d'excrétion.

PHARMACODYNAMIQUE - Étude des effets biochimiques et physiologiques des médicaments et de leur mécanisme d'action, comprenant l'établissement de la corrélation entre leur effet et leur action, d'une part, et leur structure chimique, d'autre part.

PRODUITS BIOLOGIQUES - Préparations médicales faites à partir d'organismes vivants et de leurs produits, entre autres les sérums, les vaccins, les antigènes, les antitoxines, les antibiotiques, etc.

TOXICOLOGIE - Toutes les connaissances accumulées au sujet des poisons, de leur étude scientifique, de leur action, de leur détection et du traitement des effets qu'ils entraînent.

TOXICOLOGIE GÉNÉTIQUE (ou mutagénèse du milieu) - Se rapporte à la sous-discipline spécialisée de la toxicologie *in vitro* qui s'intéresse à l'identification des substances qui induisent des modifications génétiques chez les micro-organismes, les cellules de mammifères en culture et soit les cellules somatiques, soit les cellules germinales des plantes et des animaux.

Depuis le milieu des années 1970, une activité de recherche considérable en ce domaine, notamment en ce qui a trait à la mutagénèse environnementale, a entraîné le développement d'une diversité d'essais biologiques à court terme conçus pour permettre de déceler divers seuils cytologiques et génétiques.

TOXICOLOGIE *in vitro* - Se rapporte à l'étude de la réaction des cellules en culture à des substances toxiques. Les essais sont conçus pour permettre de déterminer les agents xénobiotiques induisant des points de virage connus pour être nocifs à la santé humaine, et ce, à partir de corrélations avec des données biochimiques et pathologiques.

XÉNOBIOTIQUE - Produit chimique étranger au système biologique.

RAPPORT SOMMAIRE

Les toxicologues de l'Amérique du Nord chargés de la réglementation se trouvent actuellement confrontés à :

- un inventaire de 70 000 produits chimiques «existants»;
- plus de 1 000 «nouvelles» soumissions de produits chimiques chaque année (Environmental Protection Agency-États-Unis);
- l'absence de renseignements sur la toxicité de 25 p. 100 et 38 p. 100 des médicaments et pesticides respectivement (plus de 75 p. 100 de produits chimiques commerciaux);
- très peu de données sur la toxicité de 39 p. 100 et 36 p. 100 d'autres médicaments et pesticides;
- les exigences croissantes du public en matière de législation sur le contrôle des risques pour l'environnement et la santé ainsi que la protection contre de tels dangers;
- les revendications de plus en plus nombreuses et pressantes pour réduire l'utilisation d'animaux;
- la pression exercée par les industries pour obtenir l'homologation de nouveaux produits.

Un examen de ces problèmes permet d'envisager sous une perspective valable les tendances actuelles de la toxicologie *in vitro* ainsi que la modification des méthodes d'essai traditionnelles.

Dans les chapitres 3.0 et 4.0, il sera question des forces et faiblesses des systèmes d'essais traditionnels (*in vivo*) et à court terme (surtout *in vitro*). Une comparaison de leurs avantages et leurs inconvénients est proposée au Tableau I.

TABLEAU I

Tableau comparatif des méthodes d'essai *in vivo* et *in vitro*

Article	*In vivo*	*In vitro*
Données historiques	considérables	très limitées
Classification	utilisation internationale	pas utilisée
En tant que substrat à la réaction	interaction de «l'animal entier»	cellules isolées, organes
Besoins d'essais réglementaires	ne peut y répondre déficit croissant	pourrait y répondre réduction du déficit
Coûts - essais aigus - cancérogénicité	modérés 1 million de dollars chacun	bas modérés
Perception du public	surtout négative	surtout positive
Valeur prédictive	la meilleure disponible	à l'étude

Les valeurs prédictives des essais sur la génotoxicité et des essais biologiques sur les rongeurs sont étudiées en détail. La fiabilité des premiers a donné lieu à certaines réserves (pages 15; 52) et des publications récentes ont montré que l'intérêt des essais sur la mutagénicité, en tant que prédicteurs des risques de cancer, pouvait être très limité (pages 18; 54). Certains en ont déduit que les essais à court terme avaient généralement peu ou pas de valeur, une conception erronée fondée sur une interprétation douteuse des conclusions du rapport du programme national américain de toxicologie concerné (Tennant *et al.*, 1987). Ces résultats sont actuellement soumis à une réévaluation expérimentale critique (pages 18-20). Les discussions qui en découlent donnent lieu à une réévaluation utile du rôle des essais sur la mutagénèse, une reconnaissance de leurs limites, et attirent une attention redoublée sur les essais sur la toxicité *in vitro* (pages 56-57).

À différents endroits du présent rapport, on met en évidence que la modification et l'amélioration des essais existants dans les deux systèmes ainsi que leur utilisation complémentaire à trois niveaux offrent les meilleures chances de résoudre, dans l'immédiat, bon nombre des problèmes auxquels est confrontée la toxicologie réglementaire.

En ce qui concerne le développement d'autres procédures, les solutions à long terme exigeront un effort de recherche bien plus grand et bien plus spécialisé, notamment dans les domaines de la toxicologie *in vitro* autres que la mutagénèse. Le développement d'essais sur les cancérogènes non génotoxiques, comme les métaux, les fibres minérales, les substances à action hormonale, tous les produits pouvant poser des risques pour les Canadiens, constitue une priorité. Le temps de latence extrêmement long des tumeurs constaté dans le cas d'un grand nombre de ces agents rend leur dépistage incertain au moyen d'essais sur les rongeurs (page 57).

L'état actuel des essais sur la toxicité aiguë est traité de manière assez détaillée :

- les études de validation des procédures *in vitro*, ainsi que les essais modifiés sur les animaux, sont présentés en termes d'objectifs, de critères et de problèmes rencontrés.

- Il semble nécessaire qu'un accord ferme soit conclu au niveau international au sujet des normes et des critères ainsi qu'au niveau de la réglementation pour accepter des tests dûment validés (pages 20; 21).

- Plusieurs grandes études internationales de validation sont actuellement en cours; elles bénéficient d'une aide et d'une participation appréciables des organismes de réglementation nationaux et internationaux (pages 28-30).

- L'annexe I traite de l'étude de validation internationale de l'essai à dose fixe qui a pris fin récemment et qui a obtenu la sanction de l'Organisation pour la coopération et le développement économiques (OCDE) et de la Communauté économique européenne (CEE) (page 28).

- En Europe, les organismes de réglementation nationaux et internationaux ont joué un rôle prééminent quant à la coordination et à l'appui des études de validation (page 68).

- Les organismes fédéraux des États-Unis participent à certaines études de validation internationale.

Les études de validation sur les méthodes substitutives ou modifiées, ou les deux, de l'essai sur les effets irritants pour les yeux obtiennent une participation et un appui considérables du secteur industriel en Europe et en Amérique du Nord (pages 34-36). Une longue liste annotée des méthodes substitutives possibles aux essais sur les effets irritants pour les yeux est fournie (Annexe 4).

Aux États-Unis, le John Hopkins University Center for Alternative to Animal Testing (CAAT) occupe une position de chef de file (page 37). La plus grande partie du budget annuel du CAAT, qui s'élève à 1,8 million de dollars, est consacrée à la recherche intra-muros et extra-muros, et elle provient du secteur industriel. Aux États-Unis, dans le secteur public, le chef de file de la recherche en toxicologie *in vitro* est le National Toxicology Program du NIEHS qui a alloué 17,7 millions de dollars, ou 22 p. 100 de son budget, à la recherche de méthodes substitutives et à leur validation en 1988 (page 58).

Les programmes de recherche fort imposants en vigueur au sein de plusieurs laboratoires sont décrits de façon détaillée (pages 62-68).

Les associations de l'industrie chimique et de l'industrie pharmaceutique européennes encouragent vivement le développement de méthodes substitutives aux essais toxicologiques, la première industrie (ECETOC), au moyen d'une série de monographies techniques, et la seconde (EFPIA), par la remise d'un prix de recherche bisannuel de 25 000 francs suisses. Le sujet choisi pour les concours de 1986 et de 1988 portait sur les méthodes substitutives à l'expérimentation animale (page 70).

Les activités d'un certain nombre d'associations nationales et internationales professionnellement orientées vers le bien-être des animaux, dont les programmes permanents et constructifs appuient la recherche de méthodes substitutives, sont présentées (pages 71-72).

En ce domaine, les exigences en matière de réglementation et les lignes directrices font actuellement l'objet d'un examen approfondi de Santé et Bien-être social Canada et d'Agriculture Canada. Ce sujet est abordé au chapitre 7. Les tendances prometteuses, quoique limitées, de la recherche en toxicologie *in vitro* au Canada sont le fait des travaux entrepris dans les laboratoires de la Direction générale de la protection de la santé. Au chapitre d'autres projets, citons le réseau canadien de centres de toxicologie récemment établi (page 78) et le résultat de sept années exemplaires de travaux entrepris conjointement par l'Université de Colombie-Britannique (UBC) et la SPCA de Colombie-Britannique pour soutenir la recherche de méthodes substitutives (page 81).

Les essais de remplacement dûment validés (par opposition à la réduction faite par une modification de l'essai ou l'utilisation complémentaire de systèmes *in vivo/in vitro*, ou les deux) sont rares. Le test LAL (lysat d'amébocytes de limule), un remplacement à l'utilisation de lapins dans les tests pyrogènes, un test de culture tissulaire pour contrôler l'efficacité du vaccin contre la fièvre amarile, la méthode HPLC au lieu de souris dans les tests d'insuline et un test d'infection de

culture tissulaire pour diagnostiquer la rage chez les animaux en contact avec l'être humain, sont des exemples cités. Au Canada, ce dernier essai permet de sauver 30 000 souris chaque année, le test des convulsions provoquées sur la souris par l'insuline exigeait 600 souris par lot.

Au Canada, les subventions stratégiques du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie (CRSNG) allouées à la toxicologie *in vitro* sont pratiquement les seules sources de financement offertes à l'occasion pour ce genre de recherche (page 80). Le présent rapport réitère l'insuffisance de l'appui financier alloué soit à la recherche, soit aux études de validation des procédures d'essais traditionnelles ou modifiées de la toxicologie *in vitro* (pages 14-15). Il est recommandé que l'industrie chimique joue un rôle plus dynamique en la matière. Le PMAC a créé, en 1989, une fondation de recherche qui pourrait avoir un impact positif sur la recherche et le développement de méthodes en toxicologie.

Un courant important et d'actualité concerne l'harmonisation internationale des exigences et des lignes directrices en matière de réglementation. Les efforts héroïques déployés en ce sens au sein de la communauté européenne (pages 28-29) en démontrent toute l'importance pour les partenaires commerciaux. Pour le Canada, l'harmonisation devrait aussi être une priorité, en raison du libre-échange avec les États-Unis (page 82).

Le rôle de chef de file du NTP et de groupes de recherche américains connexes, et celui des scientifiques d'organismes de réglementation européens, est présenté comme ayant un impact considérable sur l'évolution actuelle de la recherche de méthodes substitutives. Le rapport fail l'éloge de l'initiative dont ont fait preuve les organismes de réglementation de plusieurs pays d'Europe quant à l'organisation et à l'appui tant des études de recherche que de celles de validation. L'absence quasi totale de ce type de leadership au Canada jusqu'à présent ne passe pas inaperçue.

1.0 Introduction

Les principaux objectifs des essais toxicologiques sont la protection de la santé humaine et de l'environnement contre la contamination excessive produite par l'être humain. Au Canada, comme dans la plupart des autres pays, la responsabilité de fixer des normes de sécurité et de veiller à leur application incombe largement aux ministères fédéraux de la Santé, de l'Agriculture et de l'Environnement.

Ce mandat législatif comprend la responsabilité d'assurer que les procédures les plus appropriées soient recommandées, autorisées et utilisées pour réaliser ces objectifs.

Jusqu'à une période relativement récente, de telles décisions s'appuyaient presque exclusivement, et sans trop de contestations, sur l'utilisation et l'interprétation des essais toxicologiques traditionnels faits sur des animaux par le fabricant, ou en son nom, puisque c'était à lui qu'incombait la responsabilité de prouver l'innocuité de son produit. En règle générale, les protocoles soumis et les essais réalisés à l'appui des soumissions adhéraient étroitement, ce qui n'est pas surprenant, aux lignes directrices du ou des organismes de réglementation concernés.

Toutefois, au cours des dernières décennies, le nombre et la diversité des produits chimiques, de la physique et, plus récemment, des produits du génie biologique entrant sur le marché, ont connu une escalade progressive sans précédent. Parallèlement à cet influx, on a assisté à un redoublement d'intérêt chez le public et les médias pour les questions touchant l'environnement et la santé, ainsi que pour les moyens utilisés pour les protéger. Une des principales préoccupations était l'utilisation d'animaux dans les essais.

On pourrait croire que ces problèmes peuvent être simplement réglés en augmentant suffisamment le nombre de programmes d'essais toxicologiques existants et en surveillant étroitement la pollution de l'environnement et les soins prodigués aux animaux de laboratoire. Toutefois, même un examen superficiel des faits présentés ci-après indique clairement que cette situation ne peut pas être réglée par ces seules initiatives. Il semble que le moment est venu d'examiner complètement nos méthodes d'essais toxicologiques actuelles et, par la même occasion, le statut et le rôle possible de nombreuses nouvelles méthodes et modifications des procédures d'essais traditionnelles qui émergent.

2.0 Les tests toxicologiques

2.1 La base et les applications

Les méthodologies des tests toxicologiques sont soit pratiques, soit descriptives. Les premières se rapportent à la détermination du métabolisme et à la pharmacocinétique ayant conduit à l'apparition d'un phénomène toxique, tandis que les dernières se fondent sur les changements pathologiques et physiologiques observables à la suite de l'exposition. La classification dépend des estimations quantitatives des modifications observées dans les groupes testés et les groupes de contrôle.

L'évaluation réglementaire des risques a le plus souvent reposé sur des données toxicologiques descriptives issues des méthodes d'expérimentation animales traditionnelles. Par ailleurs, on s'est le plus souvent intéressé au mécanisme, ou aux mécanismes, en jeu dans un événement toxicologique pour mettre au point des méthodologies *in vitro*. La démonstration de la présence de tels mécanismes fournit la seule base scientifique solide permettant de faire des transpositions d'une espèce à une autre.

En l'absence de données sur la toxicité humaine, on a dû rationaliser des extrapolations faites à partir des résultats de l'expérimentation animale descriptive en se basant sur des estimations approximatives des similarités existant entre l'animal expérimental et l'être humain, par exemple les voies physiologiques communes connues et la ressemblance de leur fonction biologique.

Il est évident que ces extrapolations ont nettement plus de poids lorsqu'on comprend les mécanismes qui entrent en jeu dans un phénomène. Cet argument solide semble, dans de nombreux cas, plaider en faveur de l'utilisation combinée des données venant de l'animal intact et d'essais *in vitro* pour l'évaluation aux fins de réglementation des risques. L'augmentation rapide des données moléculaires en rapport avec le mécanisme intervenant dans le dommage cytotoxique, la mutagénèse et la cancérogénèse, devrait permettre de tirer parti de données *in vitro* sur la toxicologie cellulaire, génétique et autres, qui deviennent de plus en plus précieuses.

La plupart des protocoles des tests toxicologiques des laboratoires industriels sont suivis pour répondre aux exigences de réglementation officielles (lignes directrices), ainsi que pour la sélection préalable des formulations pour le développement de produits par les candidats. Les objectifs ultimes sont les suivants : la détermination de seuils différentiels sécuritaires, l'homologation des produits, la réception favorable du public et la protection contre tout risque de poursuites auxquelles un produit pourrait donner lieu.

Les exigences concernant la réglementation sont une prérogative de chaque nation; par conséquent, le profil pharmacologique d'un produit industriel destiné à l'exportation doit répondre aux exigences concernant les tests de toxicité des pays qui l'importeront. Cet état de fait a eu pour résultat une adhésion à des protocoles expérimentaux extrêmement normalisés et une grande difficulté de modifier, et encore plus de remplacer, tout test prescrit par les règlements. Toutefois, on a fait certains progrès au niveau de la modification des exigences nationales et on note

une tendance perceptible vers leur harmonisation, particulièrement pour certains groupes de partenaires commerciaux.

2.2 L'impasse des produits chimiques

Au cours des dernières décennies, le nombre de produits chimiques mis sur le marché, y compris les médicaments, a connu une croissance exponentielle. Aujourd'hui, il existe probablement dans le monde entier plus d'un million de produits chimiques dont 70 000 environ sont couramment utilisés en Amérique du Nord (NAS-NRC, 1984). À ce nombre viennent s'ajouter de par le monde près de 1 000 nouveaux produits chimiques chaque année (Upton, 1986). Depuis la Deuxième Guerre mondiale, la production de produits chimiques synthétiques a augmenté 350 fois; récemment, une toute nouvelle gamme de produits issus de la biotechnologie a fait son apparition sur le marché. Malheureusement, il s'agit là de tendances continues liées aux progrès technologiques, à des populations en croissance continue et à des marchés offrant, plus que jamais, des possibilités de gains considérables. Dans l'immédiat, il semble peu probable que l'offre excède la demande. Il est toutefois heureux que la plupart de ces produits soient sans danger pour la santé humaine et que l'exposition à ceux-ci restera souvent restreinte. Il va cependant de soi que l'exposition à des produits rares ou à des produits peu toxiques, voire au deux, puisse dans certaines situations présenter un problème de santé important (Silvane *et al.* 1986).

2.3 La pertinence des données toxicologiques disponibles

On possède des fiches toxicologiques à peu près satisfaisantes sur un nombre relativement restreint des quelque 70 000 produits chimiques utilisés en Amérique du Nord. Un rapport de la National Academy of Sciences (NAS-NRC, 1984) fondé sur 53 500 entités chimiques distinctes (comprenant 2 000 médicaments) sur lesquelles on dispose de données accessibles par machine, a étudié des échantillons de substances chimiques des cinq catégories suivantes :

- drogues et excipients entrant dans la formulation des médicaments;
- pesticides et ingrédients inertes entrant dans la formulation des pesticides;
- additifs alimentaires;
- ingrédients de produits cosmétiques;
- produits chimiques dans le commerce (subdivisés par quantité de production annuelle).

Chaque composé a été évalué en fonction des lignes directrices de réglementation nationales et internationales appropriées des États-Unis. Dans la vaste majorité des cas, la qualité ou la quantité des données disponibles était insuffisante pour permettre de faire une évaluation correcte des risques pour la santé.

Les insuffisances comparatives de ces données disponibles, d'une similarité surprenante dans le cas des médicaments et des pesticides, sont clairement indiquées à la Figure 1.

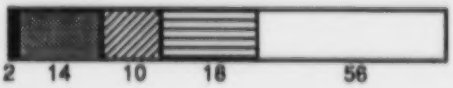
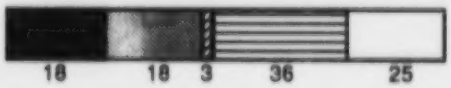
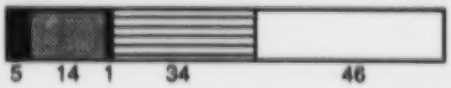
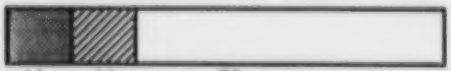
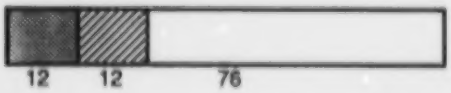
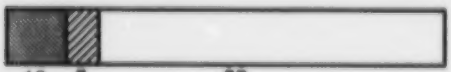
Ainsi, même pour les drogues et les pesticides, on ne disposait de données suffisantes que sur un peu plus du tiers des produits évalués. C'est sur les tests à long terme relatifs à la cancérogénicité, à la tératogénèse et aux études de toxicité

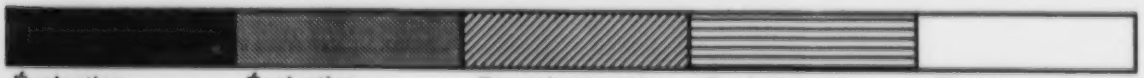
par inhalation que l'on manque le plus de données. Par ailleurs, les données sur les études relatives aux effets aigus par absorption orale et parentérale étaient beaucoup plus nombreuses.

Le Tableau II présente les pourcentages des substances de chaque catégorie pour lesquelles on dispose de données minimes sur la toxicité animale ainsi que celles sur lesquelles aucune donnée n'a été accessible.

FIGURE I

PERTINENCE DES DONNÉES SUR LA TOXICITÉ DISPONIBLES POUR PERMETTRE DE FAIRE L'ÉVALUATION DES RISQUES POUR LA SANTÉ QUE POSENT DES SUBSTANCES DESTINÉES À DIVERS USAGES

Catégorie	Taille de la Catégorie	Pourcentage moyen estimé dans l'univers choisi
Pesticides et Ingrédients inertes dans la formulation des pesticides	3,350	
Ingrédients de produits cosmétiques	3,410	
Drogues et excipients dans la formulation des drogues	1,815	
Additifs alimentaires	8,627	
Produits chimiques commerciaux. Au moins un million lb/an	12,860	
Produits chimiques commerciaux. Moins d'un million lb/an	13,911	
Produits chimiques commerciaux : production inconnue ou inaccessible	21,752	



Évaluation complète des risques éventuels pour la santé	Évaluation partielle des risques éventuels pour la santé	Renseignements minimum sur la toxicité	Quelques renseignements sur toxicité (moins que minimes)	Pas de renseignements sur la toxicité

adapté de NAS-NRC, 1984

TABLEAU II

POURCENTAGES ESTIMÉS DE SUBSTANCES SUR LESQUELLES ON DISPOSE DE DONNÉES À PARTIR DE CINQ TYPES D'ESSAIS DE BASE (NAS-NRC, 1984)

Catégorie de la subst. chimique	Pourcentage avec données sur les essais prescrits						% avec données sur toxicité minimum	% sans données sur la toxicité
	Taille de l'échantillon	Aigu	sous-chronique	chronique	Biologie dévelop. ou reproduct.	Muta-génicité		
Pesticide et ingréd. inertes dans la formul. des pestic.	106	59	51	23	34	28	36	38
Ingrédients de prod. cosmétiques	162	39	29	16	22	23	26	56
Drogues et excipients dans la formul. des drogues	95	75	62	39	45	32	39	25
Additifs alimentaires	212	42	34	13	20	23	20	46
Prod. chim. commerciaux avec production :								
un million lb/an	259	20	10	4	6	9	22	78
un million lb/an	136	22	8	3	4	10	24	76
inconnu	136	15	7	3	7	8	18	82

Ces valeurs reposent sur une méthode de recherche utilisée pour déterminer les renseignements minimum prescrits sur la toxicité concernant des substances dans un échantillon préliminaire en contenant 675. Cette méthode n'était pas exhaustive, d'où des renseignements supplémentaires peuvent exister dans les fichiers des industries, des organismes gouvernementaux et autres établissements.

Extrait de Lipton, A.C. (1987)

3.0 Expérimentation animale: commentaires et problèmes

Il va sans dire que les procédures d'évaluation toxicologique qui ont recours aux animaux sont nécessaires et continueront de l'être dans un avenir prévisible. Néanmoins, même si dans de nombreux cas ces tests constituent la meilleure sauvegarde dont on dispose, ils sont loin d'être infaillibles; leur mise en œuvre convenable est souvent difficile, voire impossible. Certains de ces défauts et problèmes sont examinés ci-après :

3.1 Le coût des essais (temps et argent)

Le rapport du bureau américain sur l'évaluation technologique des méthodes substitutives à l'expérimentation animale dans la recherche, les essais et l'enseignement (Office of Technology Assessment - OTA, 1986) consacre un chapitre à l'aspect économique de la question. Dans cette partie du rapport de l'OTA, plusieurs commentaires sont alarmants, par exemple, le fait que près de 500 nouveaux produits chimiques entrent chaque année sur le marché américain et que, dans le meilleur des cas, il n'est possible d'en tester pleinement que 200 au moyen des procédures actuelles et conformément aux exigences de la réglementation. Ce qui signifie qu'en Amérique du Nord, 300 produits chimiques par an viennent s'ajouter au nombre déjà élevé de tous ceux qui ne sont pas testés.

Le bureau des substances toxiques (Office of Toxic Substances - OTS) de l'agence américaine de la protection de l'environnement (EPA) a indiqué qu'il est peu raisonnable et réaliste d'espérer que les 1 300 ou plus «nouvelles» présentations annuelles de produits chimiques soumises à l'EPA feront toutes l'objet d'une analyse toxicologique complète. L'OTS considère les tests de dépistage comme des outils très utiles pour assigner les priorités des futures méthodes d'essais systématiques (Francis et Farland, 1987). En fait, cette situation semble exiger une prise de décision fondée sur les tests de sélection à court terme plus large que celle recommandée par l'OTS, ainsi qu'une approche simultanément et proportionnellement plus dynamique de la recherche et du développement en toxicologie *in vitro*.

Le coût moyen estimé par produit chimique utilisé dans une analyse de la cancérogénicité réalisée sur un rongeur est de l'ordre d'un million de dollars; par ailleurs, cette analyse s'étendra sur une période de deux à trois ans.

En se fondant uniquement sur ces facteurs, il semble convaincant, pour des raisons économiques, de faire un dépistage préalable des substances chimiques à l'aide d'essais à court terme *in vitro* soigneusement choisis, aux fins de réglementation au moins (Lave *et al.* 1988).

Toutefois, un dépistage préalable à l'aide de tests à court terme *in vitro*, rapides et peu coûteux comme méthode de tri de milliers de substances chimiques non encore testées, permettrait de découvrir indubitablement un assez grand nombre de composés potentiellement cancérigènes. Il serait alors vraisemblablement nécessaire de faire des essais de confirmation à long terme sur des animaux, ce

qui serait, sur le plan logistique, pratiquement impossible (McCormick, 1987). Cette impasse pourrait être évitée en suivant rigoureusement toute décision réglementaire prise au préalable quant aux mesures à adopter à la lumière des résultats des tests à court terme. De plus, des règlements sévères sur l'étiquetage, le transport, l'émission et les mesures relatives à la sécurité des travailleurs, dans le cas des produits chimiques utilisés dans l'industrie, ramèneraient le plus souvent les risques à un niveau acceptable, pendant que l'on tenterait de trouver des produits chimiques de remplacement plus sûrs (Balls, 1987).

3.2 Évaluation de données moins satisfaisantes

L'accent que l'on place actuellement sur les protocoles d'essais longs et coûteux signifie qu'il est possible de ne tester qu'un nombre relativement réduit de substances chimiques. Choisir de ne pas recueillir de données peut être une décision d'inertie extrêmement coûteuse lorsque la substance chimique est un puissant cancérogène (Lave, 1986). Comme l'indique le présent rapport, il est arrivé de découvrir, de manière désagréablement fréquente, qu'un produit chimique que l'on ne croyait pas toxique l'était en fait extrêmement, comme dans le cas du monomère de chlorure de vinyle. Heureusement, il est nettement moins probable que cela se produise avec les médicaments, étant donné que tous les protocoles des nouveaux médicaments doivent être approuvés par des organismes de réglementation parfois critiqués pour leur extrême prudence et leurs exigences rigoureuses. Néanmoins, des erreurs de jugement peuvent toujours se produire (thalidomide) et l'on trouve sur le marché nombre d'anciens médicaments (sur ordonnance ou sans ordonnance) pour lesquels les données ne sont pas tout à fait conformes aux normes. Lorsqu'il s'agit de prendre des décisions, l'utilité des renseignements issus des essais à court terme ne fait aucun doute, surtout en ce qui concerne l'examen de substances déjà sur le marché sur lesquelles on possède des données insuffisantes.

3.3 Considérations d'ordre moral

Il ne s'agit pas de s'étendre ici sur les arguments complexes, plus souvent d'ordre émotif que logique, avancés pour défendre ou condamner l'utilisation des animaux dans les laboratoires (ou dans la recherche où les essais jouent si souvent un grand rôle). Quoi qu'il en soit, il convient d'envisager brièvement ce sujet, étant donné que l'opinion publique peut exercer des pressions importantes, ressenties à tous les niveaux du milieu biomédical concerné par les essais aux fins de recherche.

Un grand nombre de personnes acceptent le fait que l'utilisation d'animaux peut être «nécessaire» pour protéger la santé humaine ou celle d'autres animaux domestiques ou sauvages, et pour protéger l'environnement. Il est également universellement reconnu que l'on ne doit pas infliger de souffrances inutiles aux animaux de laboratoire. Bien entendu, le problème réside dans la définition et l'acceptation de ce qui est jugé nécessaire.

Il est certain que des pressions continueront d'être exercées sur les représentants politiques et sur les décideurs au sein du gouvernement, de l'industrie et des

universités pour assurer que l'expérimentation animale est gouvernée par la stricte nécessité, et que le nombre d'animaux ainsi que les souffrances qu'ils subissent sont réduits au minimum. Cohen (1986) indique que «dans nos entreprises avec les animaux, nous avons des devoirs non fondés sur des revendications imposées sur la base des droits», opinion à laquelle très peu de toxicologues, pour ne pas dire aucun, s'opposeraient. De même, la plupart des gens conviennent qu'il est moralement préférable d'utiliser des formes de vie moins évoluées que des animaux à sang chaud, quand c'est possible. Ainsi, il est préférable d'utiliser des œufs de poule embryonnaires, des rongeurs et d'autres animaux élevés aux fins d'essais plutôt que des espèces moins courantes et moins prolifiques. Toute utilisation aux fins d'essais d'espèces rares et de primates sub-hominiens doit être fortement déconseillée, faire l'objet d'une nécessité absolue et être soumise à des règlements stricts.

L'article 7 de la ligne directrice du Conseil de l'Europe du 24 novembre 1986 a été citée par Balls (1987) et semble convenir à la considération d'ordre moral concernant les tests de toxicité.

> «Lorsqu'une expérience doit être faite, le choix de l'espèce doit faire l'objet d'un examen minutieux et, le cas échéant, être expliqué à l'autorité concernée. Lorsqu'un choix entre diverses expériences est possible, il faut choisir celles qui feront appel à un nombre minimum d'animaux ayant le plus faible niveau de sensibilité neurophysiologique, qui causeront le moins de souffrances, de détresse ou de blessures durables et auront plus de chances de fournir des résultats satisfaisants.»

3.4 La fiabilité des essais sur les rongeurs

Il y a à peine un siècle, les produits chimiques dangereux, les ingrédients alimentaires toxiques et autres agressions toxiques étaient identifiés par les réactions qu'ils provoquaient chez l'être humain (vomissements, irritation aiguë, maladie et même décès). Avec les progrès de la pharmacologie et des connaissances médicales du début du siècle, les concepts actuels en matière de tests de toxicité se sont progressivement forgés et avec eux, l'évaluation des risques, les tests d'innocuité et les règlements en matière de toxicologie tels qu'on les connaît aujourd'hui.

Des protocoles comme la DL 50 et les essais de Draize sur les effets irritants pour les yeux et la peau ont été introduits il y a environ 50 ans, et il est devenu courant de les utiliser de plus en plus pour tester des produits autres que les drogues et les pesticides, bien que cela ne soit pas exigé par les règlements, en réponse à la sensibilisation des consommateurs et à cause de la responsabilité civile inhérente aux produits (Goldberg, 1986).

Aujourd'hui, la plupart des tests de toxicité utilisés à des fins de réglementation sont ceux effectués sur les animaux entiers, plus couramment les essais sur les

rongeurs. Peu, voire pas, de procédures d'essais de toxicologie *in vitro* datent de plus de 15 ans, et la plupart des essais toxicogénétiques remontent au test de la mutation réverse du test salmonelle-microsome (Ames *et al.*, 1975).

Bien que les essais sur les rongeurs aient généralement été très efficaces pour protéger le public des dangers à la fois aigus et à long terme présentés par les substances chimiques, ils n'ont néanmoins pas toujours permis de prédire les dangers pour l'être humain. Citons comme exemple le manque apparent d'effets cancérigènes au bout de 30 ans chez 121 personnes exposées accidentellement à une dose suffisante de tétrachlorodibenzodioxyne (TCDD) pour induire des symptômes toxiques aigus et chroniques secondaires (Zack et Suskind, 1980) et cela en dépit du fait que le TCDD est l'un des plus puissants agents inducteurs de tumeurs de la peau et du foie chez les rats et les souris (Abernathy et Boreiko, 1987). Ce rapport soulève l'inquiétante question : y-a-t-il des agents potentiellement cancérigènes pour l'être humain dont nous n'avons pas conscience parce qu'ils n'ont pas d'activité dans les essais sur les rongeurs? (Butterworth, 1987)

Il existe toujours la possibilité que des essais donnant des résultats faussement négatifs permettent qu'un produit très toxique soit lancé sur le marché; c'est pourquoi il est requis de tester plusieurs espèces, les deux sexes, etc.

En l'absence de preuves épidémiologiques ou de données impliquant un mécanisme toxicologique commun (très souvent fondées sur des études *in vitro*), il convient d'être prudent lorsqu'on transpose des données valables pour les rongeurs en termes humains et vice-versa. Certains exemples bien connus soulignent ce point, comme la sensibilité du fœtus du rongeur à l'induction de la fente palatine par des corticostéroïdes, une condition à laquelle d'autres fœtus de mammifères, y compris ceux de l'être humain, ne sont pas sensibles. Inversement, les fœtus humains sont bien plus sensibles à la thalidomide que ceux des lapins.

4.0 Les tests de substitution : commentaires et problèmes

4.1 L'influence des groupes de protection des animaux

Il ne fait aucun doute que les groupes de protection des animaux ont exercé une influence et continueront d'en exercer une sur le développement et l'adoption de procédures traditionnelles modifiées et *in vitro*, que ce soit par la publicité, les pressions politiques et le financement d'activités de recherche et de développement de méthodes substitutives.

À l'heure actuelle, le développement de méthodes substitutives est en majeure partie le fait de la recherche biomédicale qui a découvert de manière plutôt fortuite ces méthodes nouvelles ou modifiées qui n'étaient pas le but principal des recherches entreprises. Cette situation et ces attitudes semblent être en voie de changer, du moins à l'échelle internationale, à mesure que la toxicologie *in vitro*, en tant que discipline, ainsi que la notion de procédures de remplacement et de modifications des essais pour réduire l'expérimentation animale dans les essais sur la toxicité, s'établissent de plus en plus fermement. Cet état des choses est particulièrement apparent dans certains pays européens où la protection des animaux est mieux suivie et les pressions politiques (les partis Verts, etc.) sont les plus fortes.

Aux États-Unis, un certain nombre d'études et de rapports ont été récemment publiés en réponse aux requêtes de la législature fédérale et des États d'effectuer une étude sur l'utilisation des animaux dans les essais (NRC, 1988) et des rapports sur d'autres méthodes possibles (OTA, 1986; Université de Californie, 1988).

Ces rapports soulignent le fait que, par nécessité, les essais sur les animaux continueront d'être faits et utilisés dans un avenir prévisible, et que tous les efforts devraient être déployés pour trouver des solutions de rechange efficaces. À cet égard, il est généralement admis que la modification des méthodes d'essais traditionnelles, dans le but d'utiliser moins d'animaux et dans de meilleures conditions (moins stressantes), représente le progrès le plus immédiat en ce sens. Tous ces rapports soulignent, avec justesse, les dangers qui menaceraient la sécurité du public et les progrès biomédicaux si une législation indûment restrictive était introduite dans un réflexe d'opportunisme politique.

4.2 Le financement

Une grande partie de l'appui financier alloué à ce type de recherche aux États-Unis et en Europe vient du secteur industriel, ce qui reflète une réaction aux pressions exercées en faveur de la protection des animaux ainsi qu'aux réalités d'ordre économique. L'industrie canadienne n'a pas, jusqu'à présent, réagi de manière comparable. La faiblesse chronique du financement alloué à la recherche au Canada, dont celle effectuée en toxicologie, persiste en dépit d'un marché canadien très lucratif pour les produits de cette industrie.

Un obstacle majeur au progrès de la recherche appliquée faite dans les universités, et au développement des procédures de toxicologie *in vitro* en particulier, peut être dû à l'ambivalence dont font preuve les principaux organismes de financement quant à la subvention de tels projets. Ainsi, à cet égard, le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) a souligné qu'il encourageait le recours à des méthodes substitutives à l'expérimentation animale (alinéa 16 du *Guide des prix du CRSNG*) et que «... les activités de recherche visant à mettre au point des solutions pour remplacer l'utilisation d'animaux de laboratoire sont admissibles à un appui financier dans le cadre des programmes habituels d'aide à la recherche. Bien que le CRSNG n'ait pas affecté de fonds à cette fin, rien n'empêche les chercheurs universitaires...(de le faire)».

Un peu plus loin, ce même rapport indique, en parlant des chercheurs qui développent des méthodes substitutives dans le cadre de leurs programmes de recherche permanents, que le développement d'une méthode substitutive n'est pas nécessairement le but du programme mais un sous-produit. C'est au chercheur qu'il incombe d'exploiter davantage une technique de rechange aux fins de recherche ou d'essais. Malheureusement, ces dispositions ne permettent pas la mise au point complète d'une méthode et de sa validation tel que l'exige le règlement. De plus, il n'y a aucune indication révélant que les organismes gouvernementaux de réglementation en question soient prêts à relever ce défi, comme l'ont fait avec un succès notable plusieurs organismes semblables en Europe. Un représentant responsable du Conseil de recherches médicales (CRM) a indiqué que son organisme adhérait essentiellement à la même politique. Il faudrait souligner que le CRSNG a mis en place d'autres programmes qui appuient un peu plus l'aide à la recherche appliquée. Ils sont mentionnés à la rubrique *Subventions de recherche* (page 80).

En moins de dix ans, des centres consacrés à la toxicologie *in vitro*, comme les laboratoires de l'Université Rockfeller (N.-Y.), le Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT) de l'université John Hopkins, et le National Toxicology Program (NTP) du National Institute for Environmental Health Sciences (NIEHS), ont été créés.

En Europe, plusieurs instituts semblables ayant relativement la même importance jouent un rôle majeur dans le développement de nouvelles procédures *in vitro* et sont le fer de lance des études de validation. Là encore, il ne fait aucun doute que le développement, et dans la plupart des cas, le financement de ces établissements aient été favorablement influencés par les préoccupations toujours manifestes du public sur cette question.

Au Canada, il n'existe aucun institut comparable et les unités de recherche affiliées aux universités qui se consacrent principalement aux études liées à la toxicologie *in vitro* connaissent des difficultés de financement chroniques. La Fondation J.F. Morgan a été récemment établie dans l'espoir de redresser ce problème en encourageant une plus grande aide à la recherche industrielle orientée à ces fins.

4.3 Résultats faussement positifs des essais à court terme

Un rapport portant sur 73 substances chimiques (Tennant *et al.*, 1973) déterminées par ces derniers ou dans une étude précédente du NTP (Shelby et Stasiewicz, 1984) comme étant non cancérigènes, a indiqué que 25 de ces substances pouvaient être classées comme étant des agents faussement positifs (mutagènes mais non cancérigènes). Ce rapport, ou du moins les chiffres relatifs aux «agents faussement positifs», souvent pris hors de leur contexte et acceptés aveuglément, a fait planer beaucoup de doutes sur la valeur prédictive de l'essai *S. typhimurium*. Le rapport de Tennant, peut-être faut-il s'en réjouir, a marqué la fin d'une décennie d'essais *in vitro* qui a entraîné la prolifération de beaucoup plus de 100 essais de mutagénicité à court terme impliquant des micro-organismes, des cultures de cellules et des animaux intacts, et sur la plupart desquels on disposait de peu ou pas de données acceptables pour les valider.

L'essai *S. typhimurium* (Ames *et al.*, 1975) a été l'essai à court terme le plus largement utilisé, en partie parce qu'il est rapide et peu coûteux, mais aussi en raison des nombreuses corrélations positives publiées entre ce test et les essais sur les rongeurs relatifs à la cancérogénicité. C'est également celui qui répond le mieux aux critères de validation (page 20).

Si, selon le rapport de Tennant *et al.* (1987), la fréquence des agents faussement positifs reflète fidèlement la situation de tous les agents non cancérigènes, on peut sérieusement mettre en doute l'utilité de l'essai *S. typhimurium* pour dépister les substances chimiques cancérogènes et, par le fait même, celle de tous les autres essais à court terme sur les effets cancérigènes possibles fondés sur la mutagénicité.

4.4 Évaluation de la génotoxicité

Tennant *et al.* ont lancé deux messages contradictoires : il faut abandonner tout espoir de voir soit un essai unique à court terme, soit toute une batterie d'essais à court terme remplacer les essais à long terme sur les rongeurs et ces essais jouent un rôle important pour la santé en déterminant les agents cancérigènes possibles et les agents génotoxiques qui peuvent exercer des effets par mutation somatique. Il a été judicieusement souligné que bien que deux messages aient été transmis, de nombreux lecteurs n'en ont retenu qu'un, à savoir «que les essais à court terme ont peu d'utilité (pour ne pas dire aucune) pour déterminer quels agents sont cancérigènes et quels agents ne le sont pas chez les rongeurs» (et, par inférence, chez l'être humain) (Brockman et De Martini, 1988). En outre, ces chercheurs conseillent de faire preuve de prudence en tirant des généralisations des conclusions précises de Tennant *et al.*

Une réévaluation importante de la mutagénicité et de la cancérogénicité des substances chimiques déterminées comme étant «faussement positives» avec le test de mutagénicité *S. typhimurium* a été indiquée récemment dans plusieurs mises au point. Les auteurs ont trouvé bon d'éclaircir ce message et ils ont démontré que les données sur la cancérogénicité (animale) peuvent engendrer tout autant, sinon

plus, de difficultés et d'incertitudes que les données sur la mutagénicité (Prival et Dunkel, 1989).

Ces réévaluations critiques ont une extrême importance en ce qui concerne les attitudes dans le milieu des chercheurs et des responsables de la réglementation; c'est pourquoi elles méritent d'être examinées en détail.

Les études précédentes corrélatives ont souffert du peu de fiabilité de la classification des substances chimiques identifiées comme non cancérigènes. Des essais insuffisants sur la cancérogénicité ont rendu difficile l'établissement d'une liste des agents non cancérigènes.

Le précédent programme d'essais sur la cancérogénèse du National Cancer Institute, poursuivi par le National Toxicology Program (NTP), utilise un protocole normalisé jugé satisfaisant pour faire la distinction entre les agents cancérigènes et les agents non cancérigènes. Dans ces conditions, en utilisant 60 produits chimiques considérés non cancérigènes, Shelby et Stasiewicz (1984) ont constaté que 22 (37 pour 100) d'entre eux étaient des agents mutagènes «faussement positifs». Tennant *et al.* (1987) ont ajouté quatre autres agents «faussement positifs» à partir de 29 autres agents non cancérigènes (une incidence de 14 pour 100 d'agents «faussement positifs»).

Ces substances chimiques testées par le NTP ont été largement utilisées par d'autres comme base d'agents non cancérigènes reconnus dans les études de validation des essais à court terme.

La nouvelle évaluation de Prival et Dunkel (1989) a révelé qu'en utilisant des critères plus rigoureux, l'essai *S. typhimurium* pouvait plus spécifiquement déterminer les effets mutagènes et que l'application des mêmes critères, en ce qui concerne l'incidence des «vrais positifs», entraînait une réduction de la sensibilité (un nombre moins élevé de cancérigènes mutagènes).

La réévaluation des données sur la cancérogénicité a montré que sur ces 25 «faux positifs» avec le *S. typhimurium* (mutagènes parmi les non cancérigènes), deux étaient absolument non cancérigènes chez deux espèces de rongeurs. Deux autres substances chimiques étaient, en fait, des cancérigènes et pour 21 autres, une inadéquation a empêché leur classification définitive.

On a été dit que la disparité entre 37 p. 100 et 14 p. 100 de faux positifs des deux études du NTP indiquait le niveau élevé d'incertitude associé à ce genre d'études corrélatives. La réévaluation a fait ressortir la possibilité qu'une source importante de disparités soit attribuable à la présence d'impuretés à un niveau suffisant pour affecter la mutagénèse, mais insuffisant pour se manifester dans les essais sur les animaux intacts (ces impuretés peuvent être autant cancérigènes que mutagènes). Bien qu'il soit improbable que 2 p. 100 d'impuretés chimiques aient des effets cancérigènes suffisants sur un animal intact, testés à 1 000 mg par plaque, ils équivalent à 20 mg d'impuretés par animal. Cette concentration suffirait généralement à provoquer une réaction mutagène «positive» facilement repérable. Le fait qu'un certain nombre de substances chimiques ayant donné un

résultat positif pour la mutagénicité aient présenté des effets plus importants seulement à des doses de 1 000 mg ou plus par niveau de plaque semble confirmer cette possibilité.

Ce résultat, ainsi que ceux d'autres rapports, souligne l'extrême difficulté de dresser une liste satisfaisante des composés non cancérigènes aux fins de validation, et il indique «qu'en définitive, il est possible que le seul moyen de valider les essais à court terme soit de démontrer que les effets observés dans l'essai à court terme sont le résultat d'un mécanisme d'action assez semblable à celui qui peut déclencher le processus cancérogène *in vivo*».

4.5 La validation

Il est impératif d'évaluer les méthodes qui utilisent un moins grand nombre d'animaux et les méthodes existantes, modifiées dans le but de diminuer le stress et la souffrance des animaux, afin de vérifier qu'elles ne réduisent pas la valeur prédictive de l'essai traditionnel sur lequel elles sont fondées. Lorsqu'une méthode existante est acceptée à des fins de prédiction précises, la démarche à suivre pour comparer les résultats est assez simple. Ces études doivent être faites à l'aveuglette, en utilisant plusieurs substances chimiques représentatives de différentes classes chimiques et idéalement, plusieurs laboratoires employant les mêmes souches d'animaux, de lignées cellulaires, etc. Les résultats obtenus sont ensuite comparés aux résultats d'un ensemble parallèle d'essais suivant la procédure traditionnelle ou systématique.

La validation d'une procédure *in vitro* ou de toute autre procédure complète de remplacement est cependant bien plus complexe. Selon Goldberg (1986), les principales étapes de ce genre de démarche sont les suivantes : normalisation et transfert technologique; identification d'un «étalon or» aux fins d'évaluation; compréhension de l'importance d'une base pratique; définition des classes chimiques; établissement d'une base de données. Les méthodes utilisées en toxicologie *in vitro* sont relativement nouvelles et souvent innovatrices. Il fait peu de doute qu'elles joueront un rôle encore plus grand dans l'évaluation des risques, bien qu'assez lentement. Ce genre de méthodes doit, de toute nécessité, être évalué en fonction d'un «étalon». Dans l'idéal, étant donné que l'évaluation des risques à laquelle elles doivent fournir des données concerne la sécurité humaine, l'étalon doit tenir compte des réactions humaines. L'Agence internationale de recherches sur le cancer (AIRC, 1987) signale seulement 26 agents chimiques ou classes de produits chimiques comme cancérigènes humains confirmés. Une question se pose donc : «Quel doit être notre étalon or'?» (Goldberg, 1986). Et si, par la force des choses, nous devions utiliser un étalon moins fiable, quelles réserves devons nous avoir concernant les évaluations ou les comparaisons sur lequel elles sont fondées?

Vu l'abondance de données relatives aux essais sur les rongeurs qui peuvent être utilisées pour les essais toxicologiques sur la cancérogénicité, les données sur les rats ou les souris sont devenues, par défaut, «l'étalon or» dans la validation des essais *in vitro* de remplacement, quoique avec certaines réserves (Clayson, 1987; Ames *et al.*, 1987).

L'incertitude des résultats des essais sur les rongeurs cherchant à déterminer la cancérogénicité a attiré une attention critique (Lave *et al.*, 1988). En se fondant sur une étude du National Toxicology Program des États-Unis, faite sur des rats et des souris, la moitié des 214 substances chimiques étaient des cancérigènes possibles pour chaque espèce, la concordance entre espèces n'étant toutefois que de 70 pour 100 (c'est-à-dire les deux espèces étant toutes deux positives ou toutes deux négatives) avec ces substances chimiques. Lave *et al.* (1988) ont déclaré : «Combien de substances chimiques qui provoquent des tumeurs chez les rongeurs sont cancérigènes chez l'être humain? La transposition des données d'une espèce à l'autre engendre l'incertitude. Néanmoins, biologiquement, les rats et les souris se ressemblent bien plus entre eux qu'ils ne ressemblent à l'être humain.» Ils poursuivent en soulignant que ces 70 p. 100 de concordance entre les espèces de rongeurs représentent probablement un seuil différentiel supérieur à toute concordance entre rongeurs et êtres humains. Cette hypothèse est appuyée par le fait que 19 agents sur les 20 probablement non cancérigènes pour l'être humain donnaient un résultat positif dans les essais sur les rongeurs (Ennever *et al.*, 1987).

L'essai sur les rongeurs a donné des résultats positifs dans l'une ou l'autre espèce pour pratiquement tous les produits reconnus comme étant cancérigènes pour l'être humain et, sur cette base, il témoigne d'une sensibilité absolue. Cependant, une évaluation de son utilité complète dépend également de sa capacité à distinguer le pourcentage de substances non cancérigènes donnant un résultat négatif ainsi que celui des substances cancérigènes donnant un résultat positif. Sur cette base, on ne peut s'empêcher de mettre en doute la validité de l'essai sur les rongeurs comme «étalon or» pour l'homologation des méthodes substitutives *in vitro*, même s'il est peut-être ce qu'il y a de mieux.

Les comparaisons faites en prenant l'essai sur les rongeurs comme étalon doivent toujours être soumises à une analyse critique et toute généralisation doit être faite avec prudence, voire avec crainte. Le point soulevé par le récent rapport sur l'expérimentation animale (NRC, 1988, p. 45) quant à l'utilité d'une batterie de quatre tests pour prédire à court terme la cancérogénicité, c'est-à-dire «que quatre de ces tests ont présenté seulement 60 p. 100 de concordance avec les essais sur les rongeurs faits pour déterminer la cancérogénicité», peut ne pas être considéré comme une accusation aussi grave, à la lumière des commentaires précédents.

4.6 L'acceptation réglementaire

Un séminaire de 1986 parrainé par le groupe des produits chimiques de l'OCDE (tests de substances chimiques et protection des animaux) indiquait dans l'une de ses conclusions qu'il était nécessaire d'améliorer rapidement le dialogue entre les chercheurs scientifiques et les responsables des règlements (Lonngren, 1986). Il est évident qu'un tel dialogue est essentiel si le transfert technologique du laboratoire de recherche à l'étude de validation et à l'acceptation réglementaire doit être réalisé.

Les responsables de la réglementation hésitent généralement à adopter de nouvelles méthodes d'essais, partiellement en raison des efforts et du temps

considérables qu'il a fallu pour obtenir l'autorisation des modalités d'essai en vigueur. Cette hésitation, ou conservatisme, a été corroborée par nul autre que le U.S. *Regulatory Reporter* (Anon., 1988) qui indique : «L'évolution des exigences relatives aux essais non cliniques utilisant des animaux de la Food and Drug Administration (FDA) est un processus lent, que d'aucuns qualifieront d'imperceptible. Les pharmacologues et les toxicologues de cet organisme ne sont nullement pressés d'abandonner des essais qui leur permettent de prédire facilement les effets toxiques que certains agents thérapeutiques potentiels peuvent avoir chez l'être humain».

Les sauvegardes sont, par définition, des précautions qui, par définition encore, exhortent à la prudence (conservatisme). Le conservatisme est sans aucun doute un trait nécessaire de la réglementation, mais il n'y a aucune raison de l'assimiler à la rigidité d'esprit. Il ne fait pas de doute que la modification d'un essai ou d'une procédure *in vitro*, si l'on peut clairement démontrer que sa valeur prédictive est égale au moins à celle de sa contrepartie traditionnelle et qu'elle offre aussi des avantages au niveau des coûts, de la réduction du nombre d'animaux ou de la possibilité d'éviter d'utiliser des animaux, etc., sera acceptée par les organismes de réglementation; citons comme exemple, l'autorisation de l'essai de lysat d'amébocytes de limule (LAL) pour déterminer les endotoxines bactériennes (pyrogènes) en remplacement de l'essai sur les pyrogènes fait sur les lapins par l'OCDE et de nombreux organismes nationaux, dont la Pharmacopée des États-Unis ainsi que le Bureau des produits biologiques de la Direction générale de la protection de la santé du Canada.

Toutefois, cette démarche peut être plutôt passive qu'active et il incombe à l'autorité chargée des règlements, une fois qu'elle a autorisé avec motifs valables une méthode de remplacement ou la modification d'un essai traditionnel, d'encourager activement l'utilisation de cette méthode et de refuser de nouvelles soumissions fondées sur l'essai originel (remplaçable). Peut-être convient-il d'indiquer que la réglementation devrait signaler, dans ses grandes lignes, ce qu'elle veut ainsi que ce qu'elle ne veut pas.

Le même numéro du *Regulatory Reporter* des États-Unis susmentionné poursuit : «(...)la validation continuera d'être un point clé, étant donné que le milieu scientifique américain se tourne vers la FDA pour connaître les critères de validation à respecter pour que les essais *in vitro* deviennent des remplacements viables».

Il semble que l'idée que les principaux organismes nationaux chargés des règlements sur la protection de la santé humaine doivent faire preuve de leadership dans le développement des méthodologies d'essai, ou du moins dans leur validation, ait été acceptée par les organismes gouvernementaux d'un certain nombre de pays (c'est-à-dire par le ministère de la Santé et des Services sociaux du Royaume-Uni [DHSS] ainsi que le Bundesgesundheitsamt de la République fédérale d'Allemagne [BHS], etc.).

Un comité du CAAT récemment créé et qui représente les organismes du gouvernement, du secteur de la recherche et de l'industrie, a indiqué que

l'autorisation active exige que les études de validation soient conçues et exécutées avec la participation et la collaboration des organismes de réglementation les plus étroitement identifiés aux objectifs de l'essai de remplacement. De plus, le processus de validation de l'essai, ou des essais, en question devrait être défini par un groupe consultatif ou un groupe de coordination, là encore avec la participation de l'organisme de réglementation concerné.

Plusieurs études en cours en Europe semblent être faites suivant des recommandations semblables. Des organismes nationaux y participent et les études sont souvent coordonnées ou parrainées par la CEE, l'OCDE et divers organismes gouvernementaux. Leur développement et leur succès dépendent à la fois de la présence d'un catalyseur et d'un point central bien défini. L'absence de l'un ou l'autre de ces éléments, ou des deux, explique peut-être le manque relatif de progrès importants réalisés à l'heure actuelle en matière de développement, de validation ou d'autorisation de ces méthodes au Canada. Ces tendances internationales suggèrent qu'il est grand temps de changer les caractéristiques traditionnellement ultra-conservatrices de la politique canadienne en matière de réglementation pour la transformer en politique avant-gardiste.

5.0 Toxicité aiguë

Il incombe aux toxicologues et aux responsables de la santé publique de protéger le public contre l'intoxication aiguë. L'occurrence périodique de désastres de l'ampleur de celui de Bhopal montre que le danger d'intoxication aiguë en milieu de travail est toujours bien réel, et des intoxications accidentelles individuelles continuent de se produire en nombre considérable, sinon croissant, en raison de doses trop élevées de médicaments, de la contamination alimentaire ou de la mauvaise utilisation de produits chimiques ménagers et commerciaux. C'est aux toxicologues et aux responsables de la santé publique également qu'il incombe de protéger notre environnement, ainsi que les êtres humains et les animaux qui y vivent, contre les risques posés par les déchets industriels.

5.1 Le test de la dose létale moyenne (DL50)

La DL50 traditionnelle ou essai de la dose moyenne provoquant la mort requiert de soumettre un grand nombre d'animaux -- cinq ou plus de chaque sexe -- à un éventail de doses, en général cinq niveaux de dose, afin de calculer la dose moyenne provoquant la mort. Cet essai a été adopté de préférence à d'autres, et il a été, jusqu'à tout récemment, en dépit de ses limites, le seul test de toxicité aiguë désigné dans les lignes directrices des règlements nationaux et internationaux (Tableau III).

La DL50 a été proposée pour la première fois il y a 60 ans (Trevan, 1927) pour fournir une mesure de toxicité dotée d'un seuil précis, soit un seuil de létalité de 50 p. 100. Elle était initialement conçue et utilisée pour la normalisation de produits biologiques extrêmement toxiques (digitaline, insuline, etc.). De ce fait, cet essai est devenu le principal essai sur la toxicité aiguë au niveau international et il a servi universellement notamment à fournir la base toxicologique de la classification des substances dangereuses ainsi que de leur étiquetage (Zbinden, 1986), bien qu'il se prête moins à ces fins.

La plupart des scientifiques et des comités indépendants qui pèsent le pour et le contre de la DL50 conviennent de la nécessité de disposer d'estimations numériques de la toxicité fondées sur un seuil précis unique et sans équivoque (Home Office UK, 1979; Zbinden, 1986).

TABLEAU III

INSUFFISANCES DE LA DL50

- La valeur numérique de la DL50 n'est pas une constante biologique; elle est largement influencée par des facteurs endogènes et exogènes.
- La DL50 considère la mortalité et néglige la morbidité.
- La DL50 déterminée chez les animaux a peu de valeur prédictive quant à la dose létale pour l'être humain.
- La comparaison des DL50 chez la progéniture des rongeurs et les rongeurs adultes n'est pas une méthode fiable pour détecter les risques particuliers posés aux petits de l'être humain.
- La DL50 ne permet pas de choisir une dose fiable pour effecteur des études de toxicité à doses répétées.
- La détermination de DL50 combinées n'est pas une méthode acceptable pour évaluer le risque des combinaisons de drogues.
- La comparaison de DL50 par administration parentérale et orale est une méthode inutile et non fiable pour évaluer la biodisponibilité.
- L'utilisation de valeurs DL50 comme base de classification de substances dangereuses néglige de nombreuses propriétés dignes de considération. En outre, divers pays utilisent différents critères de classification.
- Avec la DL50, certains animaux sont soumis à une souffrance et une douleur extrêmes.

Source : Zbinden, 1986

5.2 Classification des substances toxiques

Au cours des dernières années, les toxicologues ont convenu qu'il n'est pas nécessaire que la DL50 soit mesurée avec exactitude, avec les constatations d'ordre statistique qui s'ensuivent, pour être utile aux fins de classification.

Dans la mesure où la LD50 est l'essai qui a permis d'établir le fondement de la classification de la plupart des pesticides, des produits chimiques, etc., mis à l'épreuve, elle est par ce fait même difficile à remplacer.

Des modifications apportées à la LD50 et à d'autres essais de toxicité aiguë qui n'emploient pas la létalité comme seuil précis font depuis peu l'objet d'un examen attentif. D'ailleurs, certaines des études de validation importantes entreprises en Europe (pages 28-30 et Annexe I) en traitent. Bien qu'il soit reconnu que la DL50 puisse être influencée par de nombreuses variables biologiques et par la manipulation expérimentale, et qu'elle ne sait certainement pas une constante biologique, les organismes de réglementation ont beaucoup hésité avant d'envisager d'utiliser toute autre mesure plus scientifique. Ce qui est intéressant, c'est que la constante DL50 n'a pas éliminé les différences entre les systèmes de classification des substances chimiques toxiques des organismes de réglementation des diverses nations (Tableau IV).

TABLEAU IV

CRITÈRES DE CLASSIFICATION DES SUBSTANCES CHIMIQUES TOXIQUES, DL50 ORALE

Canada	Nations Unies	CEE Norvège Suède	Étiquette de protec. du consom. des É.-U.	Étiquette de subst. toxique Suisse	Étiquette de subst. toxique et dél. Japon
Très tox. 50mg/kg	Groupe I 5mg/kg	Très tox. 25mg/kg	Extrêm. toxique 50mg/kg	Catégorie I 5 mg/kg	Substance toxique 30 mg/kg
	Groupe II 5-50 mg/kg			Catég. II 5-50 mg/kg	
Toxique 50-500 mg/kg	Groupe III 50-500 mg/kg (solides) 500-2000 mg/kg (liquides)	Toxique 25/200 mg/kg Nocifs 200-2 000 mg/kg		Catég. III 50-500 mg/kg Catég. IV 500-2 000 mg/kg (produits) 500-5 000 (substances)	Délétère 30-300 mg/kg
				Catég. V 2 000 mg/kg (produits) 5 000-15 000 mg/kg (substances)	

Source : Zbinden, 1986

5.3 Tendances actuelles en matière de réglementation

Les objections du mouvement pour le bien-être des animaux contre la DL50 pour des raisons morales sont bien connues, bien fondées, établies de vieille date, c'est pourquoi il n'est donc pas nécessaire de les reprendre dans le présent rapport.

Plusieurs examens actuels ont vivement critiqué la DL50 en invoquant des arguments scientifiques : Home Office UK (1979), Zbinden et Flury-Roversi (1981), ECETOC (1985). Des sociétés de toxicologues professionnels, comme la Société de toxicologie du Canada, ont également publié des exposés de principe critiques sur l'utilisation excessive de cet essai ainsi que sur sa présumée valeur (Annexe 2).

Le développement et la validation des protocoles de tests de toxicité aiguë acceptables pour les autorités nationales chargées de la réglementation sont une priorité de recherche et de développement et bénéficient de l'appui presque unanime des toxicologues professionnels. Toutefois, en supposant qu'une DL50 modifiée ou,de préférence remplacée par une mesure non létale, soit homologuée à l'échelle nationale (conformément à l'Annexe 1), d'autres obstacles resteront à franchir : celui de la mise en application et celui de l'harmonisation concrète des exigences des divers pays concernant la classification . À cet égard, il ne fait aucun doute que les bons offices d'organisations comme l'OCDE ainsi que de l'International Programme for Chemical Safety (IPCS) sont précieux.

La principale crainte est que si un remplacement plus scientifique devait être utilisé à la place de la DL50 comme critère de classification, la base juridique deviendrait incertaine et provoquerait des difficultés considérables entre l'industrie et le gouvernement, en matière de classification.

5.3.1 Recommandations de mise à jour des lignes directrices (1987) de l'OCDE (1989-1990)

L'OCDE a mis à jour ses lignes directrices 401 et 402 intitulées «Toxicité orale aiguë» et «Toxicité cutanée aiguë» (1986) stipulant :

- qu'une dose orale limite d'essai soit réduite de 5 000 mg/kg à 2 000 mg/kg;
- que des essais complets soient réalisés sur un sexe seulement, des essais de confirmation étant faits sur un petit nombre d'animaux de l'autre sexe;
- que les essais réalisés sur des mammifères supérieurs, comme les chiens, n'utilisent qu'un petit nombre d'animaux, sans dépasser des doses moyennement toxiques.

Il est également stipulé que : «les doses connues pour provoquer une douleur ou une détresse notables en raison de l'activité de produits corrosifs ou gravement irritants ne soient pas administrées, même lorsqu'il n'a été observé aucune mortalité aux doses tolérées».

À l'automne 1988, le comité de direction du groupe des produits chimiques de l'OCDE a annoncé son intention de préparer un document de révision détaillé sur

les résultats d'une étude internationale de validation sur la procédure à dose fixe pour les tests de toxicité orale aiguë, mise au point par la British Toxicological Society.

Trente-trois laboratoires de 11 pays ont participé à cette étude (Annexe 1) qui visait à évaluer 20 produits chimiques aux effets variant de très toxiques à relativement inoffensifs. Les résultats ont été présentés à un atelier de l'OCDE intitulé «DL50 et grandes lignes de classification : vers un changement éventuel», qui s'est tenu à Bruxelles en septembre 1989. Cet atelier portait sur les résultats de l'étude de validation des méthodes à dose fixe mises au point au Royaume-Uni et en Allemagne de l'Ouest. Certaines substitutions *in vitro* potentielles ont également fait l'objet d'un examen, mais comme leur validation n'a pas été couronnée de succès, il a été convenu que pour le moment, les tests de toxicité aiguë chez l'animal ne sauraient être remplacés. Toutefois, des réductions et des perfectionnements significatifs peuvent et doivent être apportés par le recours à la procédure à dose fixe, dont l'acceptation est hâtée à la fois par l'OCDE et par la Commission des communautés européennes (CCE). D'ailleurs, le comité de mise à jour de l'OCDE étudie à l'heure actuelle l'ébauche d'une nouvelle ligne directrice sur la procédure à dose fixe pour les tests de toxicité orale aiguë.

5.3.2 La Communauté économique européenne

Une note d'orientation concernant l'autorisation de mise en marché d'un nouveau médicament de 1987 indique qu'il n'est pas nécessaire de déterminer une DL50 précise (complète). Une évaluation quantitative de la dose létale approximative et de la relation entre la dose et l'effet devrait être effectuée, sans qu'un haut niveau de précision soit requis. «Les toxicologues doivent se fier à leur jugement lorsqu'ils conçoivent les études afin d'obtenir le maximum de renseignements pertinents à partir du minimum d'animaux possible.» (Annexe à la Directive 75/318/CEE, partie 2, chap. 1[b][1]). La déclaration de la CCE de septembre 1989 (Tableau V) appuie nettement cette position.

L'article 23 de la directive du Conseil du 24 novembre 1986 exige des États membres qu'ils encouragent la recherche orientée vers le développement et la validation de méthodes substitutives. Apparemment, la CEE envisage l'établissement d'un Centre de recherche sur les procédures de substitution des tests toxicologiques (communication personnelle de M. Patrick Murphy de la CCE).

Même s'il existe des procédures moralement plus acceptables et aussi, sinon plus, valables du point de vue scientifique que la LD50 traditionnelle, les organismes de réglementation ne les adopteront que si la plupart des pays conviennent de les accepter. Un premier pas important a été entrepris dans ce sens lors du séminaire de l'OCDE, sous la forme de la déclaration émise par la CCE (Tableau V).

TABLEAU V

DÉCLARATION DE LA COMMISSION SUR LA DL50 ET LA CLASSIFICATION DES PRODUITS

Des discussions qui ont eu lieu dans le cadre du séminaire intitulé «DL50 et grandes lignes de classification - vers un changement éventuel», qui s'est tenu à Bruxelles du 19 au 21 septembre 1989, il est ressorti clairement que l'existence de différentes approches préconisées par différents pays, associations internationales et partenaires commerciaux pour la classification des substances et préparations dangereuses constituait un obstacle certain au remplacement des méthodes classiques utilisant la DL50.

La Commission partage l'opinion de la majorité des participants au séminaire voulant qu'il soit très souhaitable de rationaliser ces grandes lignes de classification. Il est toutefois reconnu que l'atteinte de cet objectif à moyen et long terme exige un effort concerté.

Pour progresser dans ce domaine, la Commission s'engage à prendre l'initiative de l'évaluation de la faisabilité d'une telle rationalisation. Elle assurera le financement du travail préparatoire nécessaire et invitera officiellement tous les pays membres de l'OCDE, de même que les associations internationales, à participer à cette initiative.

De plus, reconnaissant qu'un tel exercice peut s'étendre sur plusieurs années et considérant qu'il est injustifié d'attendre les résultats de cet exercice avant de chercher à remplacer pour des fins de classification le test classique de la DL50 par des méthods d'évaluation de la toxicité aiguë qui soient scientifiquement meilleures et moralement plus acceptables, la Commission :

- en acceptant qu'une procédure à dose fixe qui assure des données convenables sur la toxicité pour la classification et l'évaluation des risques des préparations et produits chimiques dangereux soit vraiment disponible,

- en reconnaissant que cette procédure utilise moins d'animaux et leur cause moins de préjudices que le test classique de la DL50,

- en considérant que ce test a fait l'objet d'une validation à l'échelle internationale :

  a) s'engage à proposer l'introduction d'une procédure à dose fixe dans l'Annexe V de la Directive 79/831/CEE,

  b) s'engage à apporter les modifications nécessaires aux Annexes VI et VII de cette même Directive,

  c) s'engage à accepter les données dérivées de l'utilisation de la procédure à dose fixe, une fois que ces modifications seront officiellement adoptées et incluses dans la législation.

La Commission espère que les pays membres de l'OCDE qui ne sont pas membres de la Communauté économique européenne entreprendront une action semblable, afin d'inclure la procédure à dose fixe dans les grandes lignes de leur législation. Il est cependant clair qu'en vertu du principe de l'acceptation mutuelle des données, il sera toujours possible d'accepter également les données soumises selon les protocoles d'entente de l'OCDE.

5.3.3 La position de l'industrie européenne

L'industrie pharmaceutique de l'Europe est irréversiblement orientée vers le développement de méthodes *in vitro* comme méthodes substitutives à l'expérimentation animale dans deux buts : le but scientifique d'améliorer les connaissances fondamentales pour élucider les mécanismes pharmacologiques et toxicologiques de l'activité des principes actifs, et le but moral de réduire l'utilisation d'animaux de laboratoire (Cano, 1988).

Le Centre européen d'écologie et de toxicologie des produits chimiques industriels (ECETOC, 1985) a publié un rapport, monographie n° 6, qui établit les points suivants :

- les valeurs des DL50 et CL50 ne définissent pas la toxicité d'une substance, elles ne font qu'indiquer sa dose létale;
- lorsque la mesure DL50 (CL50) est requise par les autorités réglementaires... celles-ci ne devraient pas préciser un nombre minimum d'animaux;
- l'utilisation de la DL50 (CL50) comme base des systèmes de classification devrait être déconseillée en faveur des procédures à dose fixe;
- les autorités chargées de la réglementation devraient reconnaître que les données sur la toxicité aiguë peuvent être superflues en ce qui concerne la protection de la santé humaine contre certains produits (c'est-à-dire, ceux qui ont une activité physico-chimique certaine)... il conviendrait de formuler des arguments types pour traiter de ces points et pour qu'ils soient acceptés au niveau international.

Depuis la publication du rapport de l'ECETOC, un certain nombre de modifications importantes ont été apportées aux règlements pour réduire les exigences de la DL50; celles-ci ont été promulguées au niveau international (OCDE, CCE, etc.) et mises en application par un certain nombre de pays. Le Canada et les États-Unis, tous deux membres de l'OCDE, ont récemment manifesté leur intention d'apporter de telles modifications aux règlements relatifs aux procédures et exigences de cet essai et il est permis de croire que maintenant, ils songent sérieusement à emboîter le pas à la CCE au sujet de l'acceptation d'une procédure à dose fixe (Tableau V).

5.3.4 Les initiatives japonaises

Zbinden (1988) a indiqué qu'en 1987, le ministère de la Santé et du Bien-être social du Japon a radicalement révisé ses règlements, jusqu'alors stricts, relatifs aux tests de toxicité aiguë afin que :

- seulement une DL50 approximative sur les rongeurs soit requise;
- une dose limite de 2 000 mg/kg soit autorisée pour déterminer la toxicité orale;

- l'utilisation de deux animaux non rongeurs par dose et par sexe au minimum soit permise, à raison d'un minimum de deux niveaux de dose;

- une dose «suffisante pour induire des signes de toxicité» soit utilisée chez les non-rongeurs;

- il ne soit nécessaire d'utiliser les deux sexes que pour une espèce.

Les initiatives du Japon en matière de recherche orientée vers le développement et la validation de méthodes substitutives et de tests de toxicité modifiés comprennent une étude de 1985-1987 financée par le ministère japonais de la Santé et du Bien-être social dont l'objectif est de vérifier l'efficacité d'un test de toxicité aiguë à dose fixe simplifié, aux fins de classification des substances toxiques (Zbinden, 1988).

5.3.5 Progrès accomplis aux États-Unis (EPA et FDA)

En septembre 1988, l'Environmental Protection Agency (EPA) a annoncé une politique révisée concernant les tests de toxicité aiguë. Cet organisme examine actuellement les réactions du public à ce communiqué et procédera à la révision des lignes directrices relatives aux tests cette année même.

Cette politique révisée continuera de mettre l'accent sur l'approche tridimensionnelle adoptée en 1984. Ainsi, en l'absence de données sur la toxicité aiguë, un examen initial de composés à la structure apparentée devrait être suivi, le cas échéant, d'un essai sur le seuil différentiel. Lorsque d'autres essais sont jugés nécessaires, l'utilisation d'un prototype d'essai abrégé et bien validé, comme le sont l'une ou l'autre des méthodes suivantes, peut éviter la nécessité d'autres études sur la toxicité aiguë :

- méthodes de dose approximative létale (Kennedy *et al.*, 1986);
- méthodes des moyennes mouvantes (Bruce, 1987);
- méthode du haut et bas (up and down method) (Thakur et Fezio, 1981);
- méthode des effets cumulatifs (Gad et Well, 1982).

Dans ses directives d'orientation révisées, l'EPA incite vivement l'industrie à commencer dès maintenant à soumettre les résultats obtenus avec des méthodes substitutives qui utilisent moins d'animaux. Outre ces activités, que l'EPA prévoit investir 1,3 million de dollars dans la validation de certaines procédures établissant des relations entre la structure et l'activité (RSA) (IRCC, 1989).

Les lignes directrices relatives à la toxicité aiguë du *Red Book* de la Food and Drug Administration Agency (FDA) (*Toxicological Principles for Safety Assessment of Direct Food Additives and Color Additives Used in Foods*, US-FDA, 1982) sont actuellement en cours de révision. En octobre 1988, la FDA a publié une déclaration dans le *Federal Register* 53, No. 196, p. 39650-51, sur la politique concernant la DL50. Dans cette déclaration, il était réitéré que «la DL50 classique n'est pas requise par la FDA pour déterminer le seuil de sécurité» et que son utilisation n'entre pas dans le cadre de la politique concernant les tests de cet

organisme. La DL50 classique est l'exemple même du test tombé en désuétude. En fait, en ce qui concerne ce test, la FDA a révoqué en 1985 sa seule exigence réglementaire, qui exigeait une série de tests comparatifs de trois anticorps anticancéreux.

Dans les mises à jour courantes de son *Red Book*, la FDA recherche les vrais signes de la toxicité aiguë en utilisant un moins grand nombre d'animaux et en évitant la létalité si possible, dans le but de trouver des gammes de doses et aux fins d'études de cancérogénèse ou études de long terme, ou des deux. Ces lignes directrices continueront de reconnaître que les renseignements sur la toxicité aiguë issus des essais sur les animaux peuvent toujours servir à l'industrie, pour ce qui est de la responsabilité civile inhérente aux produits, ainsi qu'aux organismes chargés de la réglementation aux fins de classification et de gestion des situations d'urgence (intoxication alimentaire, toxines, etc.).

6.0 Les tests sur les effets irritants pour la peau et les yeux

6.1 Les tests de Draize

En règle générale, ces tests se rapportent à un seule exposition aiguë et sont conçus de manière que les effets corrosifs (l'irréversibilité des dommages), le niveau d'irritation et le mode de guérison puissent être calculés. Les effets irritants pour la peau devraient être déterminés (et ils le sont généralement) avant les effets irritants pour les yeux, en se fondant sur le fait qu'une substance irritante pour la peau sera tout aussi toxique aux tissus des yeux et qu'il n'est donc pas nécessaire de faire d'autres essais.

L'essai sur les effets irritants pour les yeux de Draize *et al.* (1944) est toujours l'essai de base sur l'animal entier servant à déterminer les effets irritants sur les yeux. Cet essai a depuis longtemps été condamné pour des raisons morales par les groupes préoccupés du bien-être des animaux. Ces dernières années, le milieu scientifique a fait des efforts considérables pour trouver des solutions de rechange *in vitro* acceptables de cet essai; plusieurs d'entre elles sont minutieusement évaluées à l'heure actuelle mais aucune n'a été généralement retenue (Frazier *et al.* 1987). Entre temps, des modifications visant à diminuer le nombre d'animaux utilisés, à améliorer les résultats et à réduire le stress, gagnent de plus en plus la faveur internationale.

6.2 Une perspective de l'industrie - Europe

Une récente monographie (1988) d'un groupe de travail de l'ECETOC fait un examen exhaustif et, dans l'ensemble, bien équilibré, de l'un des essais les plus controversés utilisés de nos jours. Cette monographie se rapporte à la ligne directrice révisée n° 405 de l'OCDE, qu'elle endosse telle que modifiée pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans l'essai de Draize et pour limiter les souffrances inutiles infligées par l'induction de réactions sévères. Les recommandations du groupe de travail de l'ECETOC sont les suivantes :

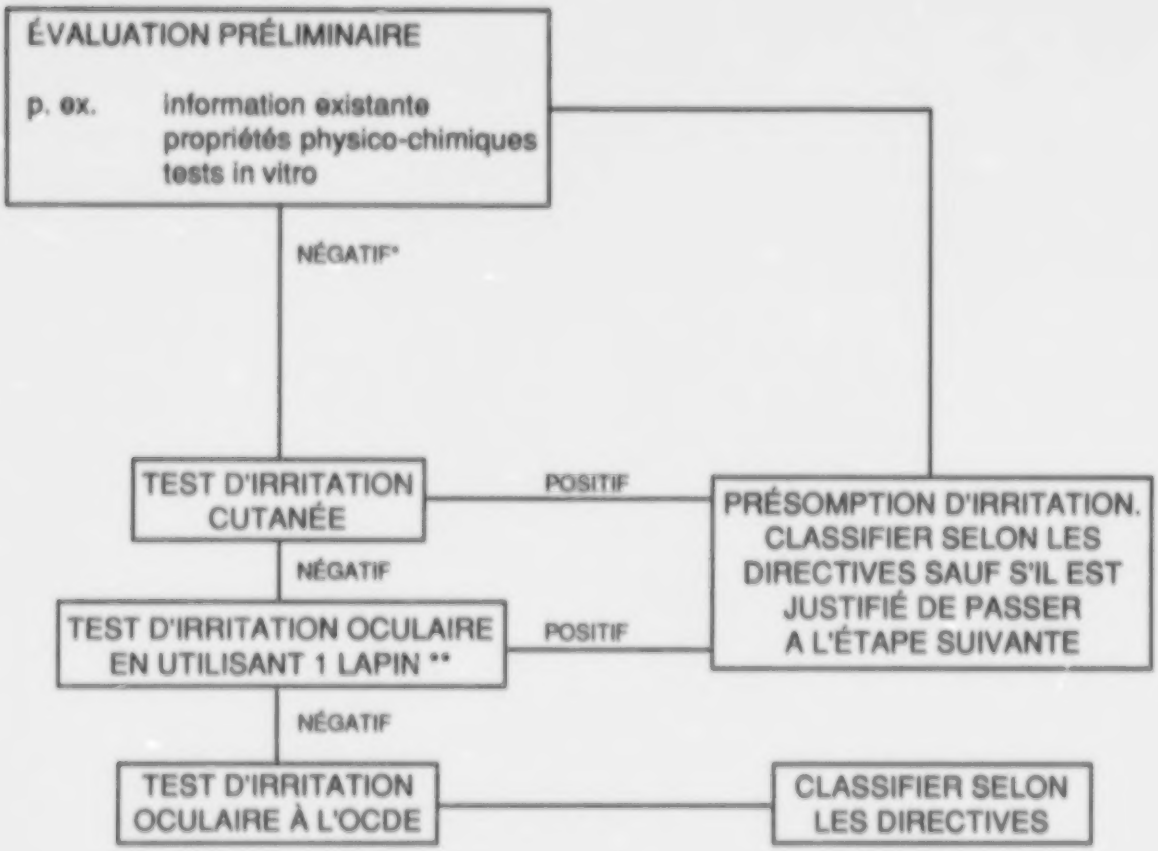
1. Il est nécessaire d'harmoniser les lignes directrices existantes concernant les méthodes de tests au sujet du nombre d'animaux requis. Il est peu justifiable d'employer plus de trois lapins dans l'essai de Draize ou d'utiliser de manière systématique des animaux supplémentaires pour les études d'irrigation.

2. Afin de déterminer de manière plus humaine les risques pour les yeux à l'aide d'un essai sur les yeux de lapins, il est recommandé de toujours utiliser une méthode de test progressive (Figure 2). Les méthodes utilisant de faibles volumes devraient être plus souvent validées.

3. Il faudrait tenir compte de la réaction des animaux lorsque la substance a été instillée pour la première fois dans leurs yeux au niveau de la classification générale d'une substance chimique comme agent irritant pour

FIGURE II

EXEMPLE D'UNE MÉTHODE DE TEST PROGRESSIVE POUR DÉTERMINER L'IRRITATION OCULAIRE



* Les critères régissant un résultat négatif ou positif sont définis par a) l'expérimentateur, ou par b) des directives internationales.

** Pour les tests in vivo, l'utilisation de matières diluées, de volumes réduits ou anesthésiques peut être indiquée et s'inscrire dans une méthode progressive de détermination d'une irritation oculaire.

Source : Monographie n° 11 de l'ECETDC, 1988

les yeux. L'essai sur les yeux de lapin ne devrait pas servir à distinguer les substances extrêmement irritantes pour les yeux des substances chimiques corrosives, en se basant sur le nombre de jours que met une lésion à guérir.

4. Il faudrait encourager la validation et le développement permanent des tests *in vitro* afin que leur potentiel de dépistage et de méthodes substitutives à l'essai de Draize puisse être évalué.

5. Il est nécessaire d'harmoniser au niveau international les systèmes de classification des risques pour les yeux; pour cela, la collaboration des organismes de réglementation concernés sera nécessaire. À l'heure actuelle, l'existence d'un certain nombre de systèmes de classification différents peut donner des classifications des risques différentes à partir des mêmes données expérimentales. Il doit être clair que toute modification des méthodes de test aura un impact sur tout système de classification des risques existant.

6. Il faudra recueillir davantage de données sur les effets des substances chimiques sur les yeux des êtres humains. Ces données sont nécessaires pour évaluer complètement la pertinence des méthodes et des systèmes de classification actuels utilisés pour évaluer les risques posés aux yeux des êtres humains.

L'annexe 4 est une liste mise à jour, utilement annotée et compilée à partir de plusieurs annexes de la Monographie n° 11 de l'ECETDC, de la plupart des tests *in vitro* soumis actuellement à un examen minutieux et qui pourraient servir de substituts à l'essai de Draize. Cette liste indique l'état d'évaluation de chaque test et contient des commentaires sur sa corrélation avec les données relatives aux essais sur les yeux de lapins *in vivo*.

6.3 Progrès récents - États-Unis

L'American College of Toxicology a publié un numéro spécial du *Journal of the American College of Toxicology* consacré entièrement aux résultats des essais aigus sur les effets irritants pour la peau et les yeux, la photosensibilisation et autres sujets connexes. Ce projet nouveau et potentiellement utile constitue un moyen de diffuser de l'information ordinairement difficile à publier. Il a été proposé dans l'espoir que ces renseignements permettront d'éviter le dédoublement et serviront de ressources utiles. Ce genre de renseignements, bien qu'utile, a une valeur de prestige relativement faible et est rarement publié.

Le fait que cette image soit en train de changer et que de plus en plus d'information sur la mise au point et la validation de méthodes substitutives et modifiées soit offerte peut être attribuable à deux facteurs : les pressions exercées par les groupes de protection des animaux et l'établissement de plusieurs centres de recherche affiliés à des universités.

6.3.1 Les centres d'étude de méthodes substitutives

Le Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT) de l'université John Hopkins, établi en 1981, et l'Alternatives Laboratory de l'université Rockefeller de la ville de New York, sont deux établissements américains renommés qui ont largement contribué aux progrès et à la légitimation de la recherche et des études de validation concernant les méthodes substitutives. Tous deux ont contribué de façon appréciable aux études de remplacements possibles *in vitro* à l'essai de Draize et ils ont bénéficié et continuent de bénéficier d'une aide financière substantielle d'associations industrielles et d'industries individuelles comme l'American Cosmetics, Toiletries and Fragrances Association (CTFA) et la Soap and Detergents Association (SDA), ainsi que de nombreuses autres entreprises commerciales, organisations préoccupées du bien-être des animaux et des membres du public.

Les activités du CAAT englobent tous les aspects des méthodes substitutives à l'expérimentation animale. Le CAAT appuie également la recherche poursuivie dans d'autres établissements en octroyant des subventions individuelles d'aide à la recherche dans les domaines de la toxicologie et de la pharmacologie *in vitro* (page 79). La majorité du budget annuel de 1,8 million de dollars du CAAT est fournie par les industries de produits de consommation. Ce centre administre son propre laboratoire de recherche en toxicologie *in vitro*, organise de nombreux séminaires de toxicologie *in vitro* auxquels il participe, et s'est taillé une réputation enviable, au niveau national et international, en servant de modèle d'interaction du gouvernement, de l'industrie et des universités.

6.3.2 Le rôle des associations d'industries

L'industrie des détergents et des savons et celle des produits cosmétiques ont largement appuyé la recherche et ont encouragé l'utilisation d'essais améliorés sur les effets sur les yeux en réponse à la pression publique. À titre d'exemple, citons la publicité faite par l'industrie sur la technique à faible volume qui réduit de dix fois le volume instillé dans l'œil du lapin. Bien que cela diminue visiblement l'irritation et donc la douleur et l'inconfort que provoquent diverses substances d'essai, les résultats de la classification varient selon les critères d'évaluation utilisés (Monographie n° 11, ECETOC, 1988) (Tableau VI).

L'industrie aux États-Unis a, elle aussi, participé activement au parrainage de programmes de collogues et d'ateliers sur les méthodes substitutives, de concert avec les établissements universitaires et gouvernementaux.

La CFTA a entrepris un nouveau programme d'envergure pour évaluer les protocoles d'essais sans expérimentation animale suivis par plusieurs de ses sociétés membres à l'étape de présélection. Ces études sont effectuées au Battelle Memorial Institute (division Columbus) et, selon certains, plusieurs de ces méthodes s'avèrent prometteuses en tant que remplacements.

A l'automne 1988, un atelier mixte de l'industrie et du gouvernement, avec la participation du public et de certaines universités, sur le thème des progrès réalisés

en faveur des méthodes substitutives à l'essai de Draize sans expérimentation animale, a permis d'aboutir à plusieurs importants points de consensus. Ceux-ci ont été résumés par J.M. Frazier *et al.* (1987) du CATT de John Hopkins et ils sont présentés dans le présent rapport comme représentant les concepts traités qui s'appliquent aux essais à court terme dans d'autres domaines présentant des difficultés, tant au Canada qu'aux États-Unis (Tableau VII).

TABLEAU VI

ESSAI À FAIBLE VOLUME
Influences du volume sur la classification

	100 ul Classé comme «irritant» par		100 ul Classé comme «non irritant» par		10 ul Classé comme «irritant» par		10 ul Classé comme «non irritant» par	
	CEE	FHSA	CEE	FHSA	CEE	FHSA	CEE	FHSA
Prod. chimiques :	6	7	8	7	3	6	11	8
surfactants : anioniques	2	5	9	6	1	2	10	9
cationiques	2	3	2	1	0	0	4	4
amphotères	1	1	3	3	0	1	4	3
mélanges	1	1	1	1	0	1	2	1
nettoyants à usage généralaa	2	13	19	8	0	11	21	10
conditionneurs de tissus	3	6	3	0	0	2	6	4
produits de lavage des tissus	0	2	5	3	0	0	5	5
condit. cheveux	1	2	2	1	0	0	3	3
	18	40	52	30	4	23	66	47

Ces résultats indiquent :

a) CEE : système de classification de la Communauté économique européenne
b) FHSA : Système du Federal Health and Safety (É.-U.)

i. Avec les deux volumes d'essai, il y a davantage de substances d'essai irritantes selon les critères du FHSA que selon ceux de la CEE. Les critères du FHSA sont donc plus rigoureux.
ii. : Une réduction du volume d'essai de 100 ul à 10 ul a donné les résultats suivants :

FHSA - 17 substances sur 40 sont déclassées en «non irritantes»
CEE - 14 substances sur 18 sont déclassées en «non irritantes»

Source : Monographie nº 11 de l'ECETOC, 1988

TABLEAU VII

RÉSUMÉ DE L'ATELIER MIXTE GOUVERNEMENT-INDUSTRIE [1]

L'atelier avait pour objectif de fournir un forum aux parties concernées pour présenter des données et discuter de la politique relative au développement et à la validation de méthodes substitutives aux procédures d'essais *in vivo* sur les effets irritants pour les yeux. Plusiers points importants ont fait l'objet d'un consensus.

- Dans l'ensemble, les organismes chargés de la réglementation du gouvernement et de l'industrie ont reconnu que le développement et la validation de batteries de tests aux fins de classification précise de substances chimiques entraîneraient une autorisation et une mise en application bien plus rapides des essais *in vitro* que si une validation universelle des essais *in vitro* était requise. Une telle démarche entre tout à fait dans le cadre des activités actuelles de la SDA et de la CFTA qui entreprennent des études de validation fondées sur des substances chimiques sélectionnées à partir soit de savons et de détergents, soit de produits cosmétiques.

- Un deuxième concept soumis à l'étude à cette réunion était qu'une évaluation combinée de l'alcalinité d'une substance chimique (qui nécessite une analyse chimique) et d'une mesure de la cytotoxicié *in vitro* pourrait éventuellement servir à sélectionner des substances chimiques, avec moins d'essais sur les animaux effectués pour confirmer les résultats, le cas échéant. Cette méthode d'essai à trois niveaux réduirait considérablement l'exposition des animaux à des produits chimiques nocifs.

- Un autre sujet important portait sur les données à utiliser dans les études de validation pour évaluer les méthodes d'essais *in vitro*. Selon le consensus, les données sur les effets irritants pour les yeux des lapins (avec l'echelle de Draize) sont la seule base de données quantitatives dont on dispose. Toutefois, il convient d'utiliser le peu de données sur les êtres humains dont on dispose (par exemple, dans les travaux de la société Proctor and Gamble) pour confirmer la classification fondée sur les résultats de l'essai de Draize. La base de données sur les lapins, bien que non optimale, peut être utilisée dans le processus de validation.

- Les commentaires des organismes de réglementation ont indiqué un besoin ressenti de faire des essais *in vitro* pouvant être interprétés en terme de mécanismes induisant la réaction toxique; une telle relation mécaniste est jugée essentielle pour faire une évaluation rationnelle des risques pour l'être humain.

- Enfin, le besoin dévaluer et de normaliser les divers systèmes de classification utilisés par différents organismes aux fins de réglementation a été déterminé. La conception des batteries d'essais *in vitro* serait simplifiée si l'on disposait de critères plus uniformes pour classer les propriétés toxiques des substances chimiques.

1 Cet atelier a été parrainé par la Consumer Product Safety Commission des États-Unis (CPSC), l'Environmental Protection Agency (EPA) des États-Unis, la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis, la Soap and Detergents Association (SDA), la Chemical Manufacturers Association (CMA), la Chemical Specialities Manufacturing Association (CSMA), et la Cosmetics, Toiletries and Fragrances Association (CTFA).

7.0 Toxicité aigue : la perspective canadienne

7.1 La Direction générale de la protection de la santé

Une directive récente émanant de la Direction générale de la protection de la santé (DGPS) semblerait appuyer sans équivoque la position voulant que dorénavant, aucun règlement de la DGPS n'exigera le recours au test classique de la DL50. Le texte de la note de service en date du 15 novembre 1989 émise par le sous-ministre adjoint, Direction générale de la protection de la santé, à l'intention du président du Comité des soins aux animaux, avec copie aux directeurs généraux des médicaments, de l'inspection des aliments et de l'hygiène du milieu, se lit comme suit :

> «La DGPS accepte certainement la recommandation du Comité des soins aux animaux voulant qu'elle adopte une politique de non-recours au test classique de la DL50 dans tous ses règlements.
>
> Les nouvelles lignes directrices de la Direction des médicaments n'exigent pas le test classique. En fonction de la toxicité du médicament et de l'espèce utilisée, l'évaluation de la toxicité aiguë doit consister à déterminer la DL50 approximative, suffisante pour établir une courbe dose-réponse, ou bien à déterminer la dose létale minimale ou le seuil de tolérance. De même, les lignes directrices indiquent que l'évaluation en parallèle de femelles et de mâles n'est dorénavant plus exigée et elles recommandent plutôt l'utilisation du sexe le plus sensible.
>
> Des copies de cette note étant distribuées aux directeurs généraux concernés, l'avis d'acceptation par la Direction générale de cette politique de non-recours au test classique de la DL50 pour tous ses règlements sera donné.»

7.2 Les exigences et lignes directrices relatives aux tests (LD50)

7.2.1 Médicaments

La Direction des médicaments de la Direction générale de la protection de la santé a rarement utilisé la DL50 traditionnelle dans ses laboratoires. Toutefois, en 1987, le ministre de la Santé de l'époque, l'honorable Jake Epp, a déclaré «... sa détermination (DL50) est une étape importante dans l'évaluation de la toxicité aiguë de toute substance à laquelle des être humains peuvent se trouver exposés. Nous devons donc continuer de l'utiliser tant qu'une solution de rechange n'a pas été trouvée.» (Anon., 1987) Malheureusement, en 1989, les recommandations relatives aux lignes directrices sur l'utilisation de ce test aux fins de présentations de protocoles de médicaments faisaient encore partie des lignes directrices de la DGPS destinées à l'industrie pharmaceutique et concernant l'homologation de nouveaux produits; de plus, dans de nombreux cas, il a été recommandé d'utiliser les données obtenues à partir d'expériences effectuées sur les deux sexes. Ainsi,

bien qu'il soit exact, littéralement, de dire que le gouvernement canadien n'a jamais vraiment requis ou exigé la DL50 (Rowsell, 1987), la prise de position précédente a rendu pratiquement impossible, du moins pour les fabricants de produits pharmaceutiques, l'obtention de l'autorisation officielle de commercialiser un nouveau produit ou une nouvelle formulation sans utiliser de DL50 ou de CL50, ou les deux.

Le fait que les essais mêmes soient rarement faits au Canada (notre industrie pharmaceutique étant essentiellement de type succursale, avec des laboratoires de tests et de recherche souvent installés ailleurs) pourrait fournir un prétexte futile et fallacieux de fuir les responsabilités, ce qui a malheureusement été parfois le cas dans le passé.

La Direction des médicaments travaille toujours à la révision de ses lignes directrices sur l'évaluation toxicologique. Les exigences initiales pour un test traditionnel de la DL50 ont été retirées et remplacées par des exigences modifiées, conformes aux lignes directrices de la DGPS susmentionnées. Ainsi, pour ce qui est du test du seuil différentiel, la DL50 approximative, l'utilisation d'un sexe seulement et de trois niveaux de dose, etc., est maintenant recommandée, dans les cas où une mesure aiguë de la toxicité relative se révèle nécessaire.

La mise à jour des lignes directrices et de la sélection du protocole de présentation de médicaments incombe au Bureau des médicaments humains prescrits. À la fin de 1987, au cours des premières étapes du processus de révision en cours, un formulaire contenant des lignes directrices non révisées sur la toxicité aiguë avait été mis en circulation au sein de la Direction des médicaments pour solliciter des commentaires et suggestions. Ce «document interne» a été soumis, non officiellement, à l'attention de personnes extérieures à la Direction de la protection de la santé tant au Canada qu'outre-mer. Cette action s'est attirée de nombreuses critiques peu flatteuses (Appendice 3).

Le processus de révision a donc été repris par la suite et a bénéficié d'un certain apport du directeur exécutif de la Fondation J.P. Morgan, une organisation orientée vers les sciences biomédicales établie à Ottawa et vouée à l'avancement des procédures de recherche et de tests *in vitro* qui réduisent l'utilisation d'animaux de laboratoire. Trois organismes nationaux externes de réglementation en matière de médicaments et un examen interne exhaustif ont par la suite produit des commentaires additionnels sur la version préliminaire révisée. Les lignes directrices révisées seront compatibles, au moins en ce qui concerne les exigences pour la DL50, avec la ligne directrice la plus récente émise par la DGPS (DGPS, page 41) et devront être en accord avec la philosophie actuelle de réglementation internationale relativement aux autres recommandations pour les tests comme la procédure de Draize pour les effets irritants sur les yeux.

7.2.2 Aliments

C'est à la Direction des aliments de la DGPS qu'incombe la responsabilité principale de déterminer les dangers pour la santé posés par les pesticides, les additifs alimentaires et les composés toxiques naturellement présents dans les aliments. Puisque l'apport alimentaire constitue la principale voie d'accès à l'organisme humain des nombreux contaminants présents dans l'environnement, le mandat résultant en matière de réglementation est très vaste. La Direction est responsable de la préparation des lignes directrices pour la conduite d'études soumises au moment de l'homologation. Ces dernières n'incluent pas d'exigence officielle test de la DL50; des estimations variées de la toxicité aiguë sont d'ailleurs acceptées.

Les tests portent généralement sur les contaminants alimentaires naturels comme les toxines fongiques et les contaminants de l'environnement qui proviennent de la fabrication humaine. Les données toxicologiques sur les pesticides sont généralement exigées de la société qui fait la demande d'homologation; celle-ci en est responsable.

Le contrôle des toxines dans les fruits de mer au Canada est basé sur des tests effectués chez la souris. Les tests portant généralement sur quatre à six souris consistent à administrer de l'extrait de mollusque aux concentrations indiquées. En 1988, environ 15 000 échantillons ont été testés au Canada, ce qui représente un nombre considérable de souris. Jusqu'en 1989, c'est la Direction des aliments qui était responsable de la surveillance de niveaux acceptables de toxines, comme l'intoxication paralysante par les coquillages, dans les différents régions de pêche de fruits de mer au Canada. Ce sont maintenant les laboratoires régionaux de Pêches et Océans Canada qui effectuent cette surveillance de routine, sauf au Québec, où la responsabilité incombe aux autorités gouvernementales provinciales. Cependant, lorsque des cas de maladie ou de décès sont rapportés, la responsabilité des tests et de la recherche revient aux chercheurs de la Direction des aliments de la DGPS.

La recherche et, jusqu'à un certain point, le recours à des méthodes substitutives pour cet essai biologique sur la souris, est toujours en cours et utilise surtout des techniques de chromatographie liquide à haute pression (CLHP) et des méthodes immunologiques. Leur application demeure toutefois restreinte, étant donné que les mollusques peuvent contenir une ou de nombreuses toxines, dont plusieurs n'ont pas encore été identifiées ni classées. Si les méthodes substitutives permettent l'identification de toxines individuelles précises, l'essai biologique sur la souris reste la méthode de choix pour évaluer la réponse générale à l'intoxication paralysante par les coquillages et par les toxines inconnues (Cembella et Todd, 1990).

7.2.3 Produits chimiques destinés à l'agriculture et protection de l'environnement

À la fin de 1988, le ministère de l'Agriculture a annoncé son intention de désigner un comité chargé d'entreprendre une révision complète de la réglementation d'Agriculture Canada, révision qui porterait sur l'homologation et l'utilisation de

produits chimiques utilisés en l'agriculture (pesticides, herbicides, engrais, etc.). Un président a été nommé en avril de la même année au sein de la Révision de l'homologation des pesticides, qui sera doté d'un conseil consultatif composé de représentants des secteurs forestier et agricole, ainsi que de représentants de l'industrie, du gouvernement et des groupes de protection du consommateur et de l'environnement. On peut supposer que les délibérations de ce comité porteront sur les procédures de tests de toxicité aiguë et autres formes de toxicité et que des recommandations seront formulées à ce sujet pour ce qui est de la protection des travailleurs agricoles et des consommateurs, ainsi que de l'évaluation des avantages liés aux risques. Il est à espérer qu'il sera également question de l'harmonisation de la réglementation canadienne avec celles des États-Unis et des autres partenaires commerciaux du Canada.

Les produits chimiques agricoles soumis aux fins de commercialisation sont étudiés par le personnel de la Direction de l'hygiène du milieu de la DGPS afin de déterminer les risques qu'ils peuvent poser pour la santé humaine. Toutefois, l'efficacité du produit et toute autre considération relative à la réglementation ainsi que la décision finale incombent à Agriculture Canada. La Direction générale de l'hygiène vétérinaire d'Agriculture Canada est responsable de l'innocuité et de l'efficacité des produits biologiques d'usage vétérinaire. Quant aux médicaments pour animaux, ils tombent sous la juridiction de la Direction des médicaments de la DGPS.

La nouvelle *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE) exige de faire des essais poussés (ce qui n'était pas le cas auparavant) sur la pollution de l'air et de l'eau, sur les émanations industrielles, etc. Comme il a été indiqué, la détermination des risques éventuels pour la santé humaine incombe à la Direction de l'hygiène du milieu de la DGPS.

L'administration de cette loi incombe à Environnement Canada, qui a déclaré que les lignes directrices de l'OCDE relatives aux tests de toxicité des produits chimiques seront respectées, ajoutant la stipulation que d'autres tests peuvent être requis et utilisés à la discrétion du ministère. La Direction de l'hygiène du milieu a à son tour assuré son adhésion aux lignes directrices de l'OCDE de façon à respecter ses engagements en matière de réglementation.

Le Service canadien de la faune est chargé d'établir des normes de contrôle de la toxicité pour protéger la faune.

Ni Agriculture Canada ni Environnement Canada ne participent de manière appréciable aux activités de recherche ou de développement en rapport avec les procédures de tests toxicologiques autres que celles expressément mentionnées au chapitre 11 (page 78); cependant, ces deux ministères surveillent les progrès réalisés en ce domaine et appuient le développement de protocoles visant à réduire ou à remplacer l'expérimentation animale.

Il est prévu que le personnel scientifique de la Division des pesticides de la Direction de l'hygiène du milieu, responsable de l'examen des présentations de protocoles pour le compte d'Agriculture Canada, consacre du dixième au quart de

son temps à des projets de recherche ou à d'autres activités d'enseignement ou de développement, ou des deux, dans les disciplines concernées. Certains de ces projets se rapportent au développement de tests de toxicité *in vitro* et aux modifications visant à améliorer l'efficacité des tests pouvant directement ou indirectement réduire l'utilisation d'animaux ou affecter l'évaluation des risques.

Il s'agit sans aucun doute d'une disposition qu'il serait souhaitable d'appuyer et de voir adoptée par les chercheurs scientifiques d'autres organismes de réglementation. Une plus grande collaboration à la recherche pourrait se justifier si les organismes de réglementation participaient activement aux études de validation ou au développement de méthodes, ou à leur amélioration, comme c'est le cas dans plusieurs pays européens.

7.3 Les effets irritants pour la peau et les yeux

7.3.1 Règlements

Les exigences et lignes directrices concernant le test de Draize sur les effets irritants pour les yeux font l'objet d'un examen attentif relativement aux lignes directrices révisées de la Direction des médicaments, mais jusqu'à maintenant, elles n'ont été que légèrement modifiées à la lumière des normes recommandées par l'OCDE. Ce test est rarement effectué, le cas échéant, dans les laboratoires de la Direction ou ailleurs au Canada. Toutefois, les exigences de la ligne directrice pour l'évaluation de médicaments nécessiteront la mise en œuvre de ce test quelque part, ce qui revient sous la responsabilité du Canada.

Le test de Draize n'a jamais été exigé ou recommandé dans les lignes directrices de la Direction des aliments. En effet, les effets irritants sur les yeux ont très peu de rapport avec le risque toxicologique posé par les aliments.

Au Canada, il n'est pas exigé que la Direction générale de la protection de la santé approuve au préalable la mise en marché des produits cosmétiques, des savons, etc; il suffit que le fabricant dispose de données montrant que ce produit n'est pas dangereux lorsqu'il est utilisé aux fins auxquelles il est destiné. Aux États-Unis, la FDA a des règlements exigeant que l'innocuité de chaque ingrédient utilisé dans un produit cosmétique et de chaque produit fini soit adéquatement justifiée avant la mise en marché, sinon il doit présenter une mise en garde évidente indiquant que son innocuité n'a pas été déterminée.

7.3.2 Responsabilités de l'industrie

La plupart des entreprises membres de l'Association canadienne des cosmétiques, produits de toilette et parfums sont des filiales d'entreprises américaines ou étrangères. Cette association participe aux activités décrites dans la section précédente au nom de la CFTA, son organisation soeur (page 37). Cependant, jusqu'à présent, cette association n'a pas directement appuyé ni encouragé des activités semblables au Canada.

Il faut souligner que l'industrie chimique dans l'ensemble, ainsi que les fabricants

de produits cosmétiques, de détergents et de savons, semblent avoir une responsabilité en ce qui concerne la modification ou le remplacement de l'essai de Draize, autant en ce qui concerne les effets irritants pour la peau que pour les yeux. Là encore, l'aide financière accordée aux chercheurs scientifiques canadiens par l'industrie semble visiblement avoir été perdue en raison de la nature subsidiaire de nombre de nos industries -- une situation que l'industrie pharmaceutique cherche actuellement à redresser, par le biais de l'Association des fabricants de produits pharmaceutiques de la Fondation de recherches en matière de santé au Canada, en tant que résultat nécessaire de la révision de 1988 afin de garantir une protection à cette industrie.

7.3.3 «Cosmétiques sans cruauté»?

Un nombre croissant d'entreprises de cosmétiques du Canada et de l'étranger affichent une tendance récente : elles annoncent leurs produits comme étant «sans cruauté», mentionnant qu'elles n'ont pas recours à des animaux pour évaluer l'innocuité de leurs produits ou pour l'élaboration de ces derniers. La UK Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (*FRAME News*, 1989[a] et 1989[b]) a souligné un certain degré de publicité trompeuse (involontaire ou non) dans ces slogans publicitaires. Le terme cruauté n'est pas défini et les expressions «sans cruauté» et «non testé sur des animaux» sont relatives et peuvent simplement s'appliquer au produit fini, et non aux ingrédients qui le composent, aux fabricants du produit fini, et non aux fournisseurs des ingrédients, etc. En vérité, ces étiquettes réfèrent aux ingrédients et formulations composant le produit et auxquels les fabricants (et les consommateurs) font confiance parce que des tests effectués sur des animaux par le passé en ont confirmé l'innocuité. La seule assurance réelle sur laquelle il est possible de compter quant à la réduction du nombre d'animaux et de leur substitution dans les tests pour cosmétiques, comme dans toutes les autres formes de tests toxicologiques et de mise au point de produits, demeure la mise au point et la validation de tests classiques modifiés et de tests de substitution.

7.3.4 Recherche

Sivak *et al.* (1987) ont mis au point, dans une université ontarienne, une méthode pour quantifier les modifications oculaires dues aux effets toxiques pour les yeux en mesurant la transmission d'un rayon laser à travers des yeux de bovins arrivant dans un abattoir. Des cristallins de ce type peuvent être maintenus intacts pendant plusieurs mois dans une culture d'organes. L'effet des substances chimiques du milieu d'essai sur la transmission et les propriétés réfringentes des cristallins est mesuré dans l'évaluation des effets toxiques. Cet essai a été recommandé comme autre remplacement possible de l'essai de Draize. Il peut aussi être utile pour mesurer les effets chroniques et subaigus d'expositions répétées de faibles niveaux à des produits optiques toxiques (pommades à usage ophtalmique, etc.) actuellement testés par un essai de Draize modifié avec expositions répétées des yeux de lapins (une démarche contestable sur le plan scientifique).

Au cours des dernières années, le mouvement canadien de protection des animaux a fourni des fonds considérables aux recherches et aux études de validation de

méthodes pouvant remplacer l'essai de Draize. La majorité de ces fonds est allée aux États-Unis, notamment pour appuyer les travaux sur l'analyse de la membrane chorio-allontoïde (CAM) d'embryon de poulet développée par Joseph Leighton du Collège médical de Pennsylvanie, Pittsburg (Pennsylvanie). Cette aide financière a été fournie par des organisations comme l'Animal Welfare Foundation of Canada, la Fédération des sociétés canadiennes de protection des animaux, la SPCA du Canada, et la Fondation Muriel Lowry.

8.0 Les tests à doses répétées

Les chapitres précédents insistaient sur la toxicité aiguë, et en particulier sur les problèmes ressentis comme étant associés à la DL50 et aux essais de Draize sur les effets irritants pour les yeux de Draize. Ces méthodes d'essai ainsi que les analyses de la cancérogénicité à long terme (chapitre 9) sont non seulement très utilisées, mais elles devraient manifestement faire elles-même l'objet, dans nombre de leurs utilisations, d'une présélection, de modifications et, dans certains cas, de remplacements.

Malheureusement, dans l'immédiat, l'espoir de voir diminuer le nombre d'essais utilisant des doses répétées et à long terme sur des animaux est toujours incertain. Cela peut expliquer le manque relatif d'attention critique prêtée à la modification ou au remplacement de ces méthodes.

Les études à doses répétées conçues dans le but de simuler la consommation d'aliments, plutôt que les tests destinés à simuler l'exposition aiguë des travailleurs, représente l'objectif principal de la Direction des aliments de la DGPS. Cette direction encourage un raffinement du protocole visant à réduire le nombre d'animaux et préconise que les procédures suivent celles établies par l'OCDE et d'autres lignes directrices mises de l'avant à l'échelle internationale. Les études de piètre conception doivent être réexaminées à la lumière d'autres données afin de réduire le nombre d'études répétées. La Direction a également indiqué que toute procédure *in vitro* validée sera examinée à des fins de réglementation. Toutefois, comme il n'existe aucun critère fermement établi pour l'acceptation de la validation, l'importance attribuée à de telles données demeure nébuleuse.

8.1 Les tests de toxicité subaiguë

Étant donné que les gens et certaines parties de l'environnement peuvent se trouver fréquemment exposés à des substances étrangères, il est souvent requis d'évaluer les effets d'une telle exposition en réalisant des études à long terme sur l'exposition orale, topique ou par inhalation à des doses continues ou, en général, répétées.

Ces tests durent habituellement jusqu'à quatre semaines; elles utilisent un nombre suffisant d'animaux pour faire une évaluation statistique ainsi qu'un dosage sous-létal, fondé sur les données sur la toxicité aiguë. Elles fournissent des données sur le ou les organes visés ainsi que le niveau des effets non contraires qui peuvent présenter de l'intérêt pour l'évaluation des risques.

À l'instar de celle de l'OCDE, la ligne directrice de la CEE relative à l'annonce de nouveaux produits chimiques (67/548/CEE) recommande que les substances ayant de faibles profils de toxicité soient initialement soumises à l'essai sur le seuil différentiel utilisant 1 000 mg/kg de poids corporel (ou plus, lorsqu'il est possible que des êtres humains soient exposés à ces substances). Des résultats négatifs à

cet essai éliminent le besoin de faire une étude de la toxicité subaiguë complète et ils devraient peser sur la décision de faire une étude de la toxicité subchronique.

On peut envisager d'omettre l'étude de la toxicité subaiguë lorsque toutes les conditions suivantes sont remplies (ECETOC, 1984) :

- la toxicité aiguë est faible;
- les essais de toxicité aiguë ne révèlent pas d'effets à retardement;
- la biodisponibilité est faible;
- le potentiel d'effets cumulatifs biologiques est faible.

Il semble que le moyen le plus efficace d'obtenir les données toxicologiques requises à un coût minimum, et avec une expérimentation animale réduite, serait d'exécuter cet essai de manière circonspecte en s'appuyant sur le concept de «l'utilisation nécessaire d'animaux».

8.2 Les études de toxicité subchronique

Ces études concernent l'exposition, pouvant durer jusqu'à 90 jours, de rongeurs à un niveau de dose approprié, qui peut devoir être déterminé au moyen d'un essai préliminaire de sélection de gamme en n'utilisant que quelques animaux.

Pour connaître le besoin de faire de telles études et pour en mesurer l'ampleur, il faut se reporter aux données sur les profils de toxicité provenant d'analyses précédentes de la cytotoxicité, de la mutagénicité, d'essais sur la toxicité subaiguë et aiguë, augmentées des renseignements sur les relations entre la structure et l'activité (RSA).

Il semble probable que dans un avenir immédiat, tout progrès lié à l'utilisation réduite de mammifères dépendra du développement de systèmes de modèles appropriés utilisant des animaux invertébrés à sang froid, et de méthodes d'analyses de la cytoxicité *in vitro* mécanistes précises.

Dans ce dernier domaine, les essais de prédiction de l'hépatotoxicité et de la neurotoxicité à court terme font actuellement l'objet d'une activité de recherche considérable et ils sont de plus en plus fréquemment envisagés et utilisés (OTA, 1986).

Le système immunitaire est un organe cible pour les agressions des substances chimiques thérapeutiques et non thérapeutiques évaluées grâce aux méthodes immunologiques traditionnelles. L'intervalle des expositions aux doses répétées pour le développement d'une solution de rechange immunologique dépend de divers paramètres, mais il est couramment testé au moyen d'un test de toxicité subaiguë ou subchronique à court terme (huit semaines), alors que les effets immunotoxiques d'une exposition chronique à faible niveau ont rarement été examinés. (Dean *et al.* 1986a).

Ces auteurs signalent qu'il n'existe aucun essai simple permettant de démontrer de manière concluante les effets stimulants ou dépressifs des substances chimiques et

des drogues sur le système immunitaire. L'utilisation d'une série d'essais *in vivo* et *in vitro* est recommandée pour faire la sélection. Ces essais devraient comprendre des expositions *in vivo* de rongeurs pour détecter l'immunopathologie et des essais *in vitro* et *ex vivo* pour vérifier l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité modulée par anticorps.

Il n'existe aucune lignée de cellules lymphoïdes ou de culture cellulaire *in vitro* validées pouvant répliquer convenablement la complexité du système immunitaire. Toutefois, l'emploi de mesures multiples sur les lymphocytes de sujets uniques et exposés permet d'utiliser beaucoup moins d'animaux, avec l'avantage supplémentaire de permettre de réaliser plusieurs différents essais sur les cellules du même sujet (Dean *et al.*, 1986b).

8.3 Les tests des effets toxicologiques sur la reproduction

Ces tests englobent autant les tests des effets sur la reproduction que ceux des effets tératogènes. Les lignes directrices européennes (ligne directrice n° 414 de l'OCDE, ligne directrice EC 67/548/CEE) recommandent d'entreprendre, pour ces deux essais, lorsque les études préalables de la toxicité subaiguë ou subchronique ont indiqué un faible niveau de toxicité, un essai sur le seuil différentiel avec un niveau de dose unique de 1 000 mg/kg. En l'absence d'effets contraires avec cet essai, il n'est pas nécessaire de faire d'autres essais et l'on peut prendre 1 000 mg/kg de poids corporel au moins comme niveau d'effets non contraires (ECETOC, 1984).

Il faudrait envisager les résultats des tests de mutagénicité en rapport avec les effets indésirables sur la reproduction, tout comme la présence ou l'absence de modification importante des organes de reproduction notée dans les tests de toxicité subchronique ou subaiguë, comme étant des facteurs déterminant le type et l'étendue de l'essai biologique devant être fait sur la reproduction (étude de la reproduction ou tératologie; essais sur une ou deux générations, etc.).

Les tests *in vitro* effectués pour déterminer les effets toxiques des substances chimiques sur la fécondité mâle ou femelle ont été développés et ils promettent d'être d'utiles additions aux essais traditionnels réalisés sur les animaux (Morrissey *et al.*, 1988); cependant, ils doivent être validés avant d'être officiellement acceptés.

En ce qui concerne les tests de tératologie, les lignes directrices de l'OCDE précisent qu'il faudrait effectuer un test avec seuil différentiel de 1 000 mg/kg de poids corporel chez les femelles gravides. Si cette dose n'induit pas d'effet tératogène dans la progéniture, il ne faut pas l'augmenter.

Un certain nombre de modèles substitutifs pour la différentiation morphogénétique ont été développés et ils pourront, en définitive, être utiles pour effectuer la

sélection préalable aux premières étapes des tests. Il s'agit de cultures d'organes de bourgeons de membres et de systèmes de tests utilisant des organismes entiers comme les embryons de poulet et les formes larvaires -- aucun de ces tests n'a été jusqu'à présent suffisamment validé pour être acceptable sous l'objectif de la réglementation (Bass, 1986).

8.4 Les exigences réglementaires canadiennes

La Direction des médicaments de la DGPS exige habituellement des études portant sur des doses à effet sublétal minimal pendant des périodes pouvant atteindre 90 jours, dans le cas de l'évaluation préclinique des risques d'effets toxiques posés par des médicaments utilisés à répétition. Dans de nombreux cas, il faut également procéder à des tests pour évaluer des effets éventuels tératogènes ou les effets sur la fécondité.

9.0 Toxicité chronique et cancérogénicité

9.1 Les tests à long terme

9.1.1 L'évaluation des risques

On a dit que l'évaluation des risques est faite dans le but de déterminer les possibilités de risques pour la santé humaine, c'est-à-dire qu'il ne s'agit pas de prouver qu'une substance n'est pas nocive, mais plutôt d'indiquer comment utiliser aux fins prévues et avec le minimum de risques, des substances chimiques et des médicaments pouvant être dangereux (ECETOC, 1984) pour permettre de faire les mises en garde recommandées concernant l'utilisation sans risque de la substance concernée (directive 67/548/CEE, article 6.1 CE).

C'est à la lumière de l'explication présentée ci-dessus que sont requis et effectués la plupart des essais sur la toxicité chronique (et dans une large mesure, subchronique). Les résultats des tests de cytotoxicité et de mutagénicité à court terme, des RSA et autres aspects utiles du profil toxicologique, comme les données sur la biodisponibilité, le métabolisme et les cellules cibles, sont utilisés pour décider s'il est nécessaire de faire une étude des effets cancérigènes ou chroniques, ou les deux.

Les études sur la biodisponibilité, la biotransformation et la toxicocinétique d'une substance renseigneront utilement sur la nécessité de faire un test complet sur les effets chroniques. Le niveau d'exposition au produit auquel on s'attend que l'être humain soit soumis ainsi que les avantages démontrables du produit sont aussi des facteurs de poids dont les organismes de réglementation doivent tenir compte lorsqu'ils procèdent à l'évaluation des risques pouvant mener à la conclusion qu'une substance a des effets cancérigènes ou qu'elle présente d'autres risques d'effets chroniques indésirables et qu'elle devrait être traitée en conséquence (étiquetage, etc.), sans études supplémentaires.

La plupart des laboratoires qui testent la cancérogénicité et la toxicité chronique d'un produit adoptent une méthode bidimensionnelle faisant appel à toute une batterie de tests de cytotoxicité (de plus en plus) et de mutagénicité, comme première étape de sélection. Au deuxième niveau, ces tests sont réalisés sur des animaux et uniquement lorsque les résultats des tests du premier niveau sont équivoques ou que les règlements sur la sécurité l'exigent.

Correctement utilisées, ces considérations préliminaires et stratégies de test servent à assurer que l'expérimentation animale est réduite au strict minimum, à des coûts moindres, conformément aux limites de sécurité.

9.1.2 Les essais biologiques sur les rongeurs

L'essai biologique de la cancérogénicité exige de faire pendant deux ans ou plus (durée de vie) des tests sur des groupes de 50 rats ou 50 souris, ou 50 rats et souris, avec le même nombre de contrôles (véhicules non traités et avec parfois un

groupe de contrôle positif ou négatif reconnu). En plus du quelque million de dollars que coûte un essai biologique complet de la cancérogénicité d'une substance chimique ou d'un médicament, d'autres obstacles limitent la confiance à accorder à la valeur prédictive de ces essais.

- Un grand nombre est nécessaire pour des raisons statistiques; de nombreuses tumeurs induites par des substances chimiques ont un temps de latence très long, avec souvent des taux d'incidence relativement faibles. De ce fait, un nombre de survivants ou un calcul de temps d'exposition inadéquats (ou les deux) peuvent facilement donner des résultats équivoques ou même faussement négatifs.

- L'incidence spontanée (incidence de fond) du cancer est élevée et les variantes liées à la susceptibilité peuvent être considérables, d'où la nécessité d'un grand nombre d'animaux.

- En raison de ces problèmes, l'utilisation de doses tolérées maximales de la substance d'essai entraînait couramment des régimes d'essais difficilement égaux au niveau des risques réels pour l'être humain.

- Les produits faussement négatifs sont connus à partir des essais sur les rongeurs (c'est-à-dire, arsenic, benzène), bien que ces essais soient en général extrêmement sensibles.

En dépit de ces limites, il semble reconnu qu'étant donné notre niveau de connaissances actuel, l'essai sur les rongeurs reste toujours le meilleur moyen d'évaluer les risques pour l'être humain.

La combinaison d'un essai biologique sur la cancérogénicité et d'un essai sur la toxicité chronique, utilisant tous deux les mêmes animaux, est pratique courante; elle coûte moins cher et permet d'avoir recours à un nombre moins grand d'animaux. Il existe à l'heure actuelle très peu d'autres moyens permettant de modifier un essai sur la cancérogénicité ou la toxicité à long terme dans le but de réduire le nombre d'animaux à utiliser ou la douleur et l'inconfort qu'on leur fait subir. À cet égard, il convient de noter que dans la plupart des études de la cancérogénèse, la souffrance est relativement faible avant les phases terminales du développement de la tumeur. Lorsqu'une tumeur devient observable ou palpable, l'animal doit alors être détruit et nécropsié.

En ce qui a trait à la plupart des essais biologiques habituels sur les effets cancérogènes, il est peu justifiable de laisser les animaux porteurs de tumeurs décelables vivre jusqu'à ce qu'ils soient moribonds. Toutefois, on peut faire exception dans le cas des tumeurs spontanées qui ne sont clairement pas reliées à la substance en question (p. ex. : les tumeurs mammaires ou les lymphomes chez certaines souches de rongeurs). La raison que l'on donne parfois pour justifier une survie prolongée est la possibilité que des tumeurs multiples se développent;

toutefois, ces tumeurs multiples sont rarement pertinentes aux fins de tels essais. On peut dire la même chose de la possibilité accrue de métastases; celles-ci, bien qu'elles aient parfois une signification expérimentale, ne modifieront généralement pas l'interprétation d'un essai biologique standard de la cancérogénèse.

Il convient peut-être de noter que dans nombre de cas, une forte proportion d'animaux utilisés pour les épreuves de cancérogénicité vont vivre tout naturellement sans que ne se manifeste une tumeur ou tout autre effet secondaire imputable au traitement expérimental.

9.2 Les tests à court terme

Il existe un très grand nombre de tests à court terme, la plupart étant des essais sur les effets mutagènes, se manifestant en seuils résultant de la perte, de dommages ou de réparations survenus au niveau de l'ADN d'une cellule ou d'un organisme testé. Parmi les autres moyens de prévision à court terme de la cancérogénicité, citons l'évaluation de la relation structure-activité (RSA) et le recours à des données informatisées.

La formation de tumeurs est généralement reconnue comme étant un processus à phases multiples en rapport avec des événements à la fois génétiques et non génétiques. Dans un certain nombre de cancers, on sait que la phase initiale (déclenchement) est déterminée par une mutation somatique, d'autres cancers étant induits par des facteurs oncogènes cellulaires ou viraux qui déterminent des altérations génétiques définissables; ainsi, ces tumorogènes peuvent être activés par des modifications génétiques qui les incitent à déclencher la cancérogénèse. Les mécanismes d'induction en jeu dans la cancérogénèse déclenchée par d'autres agents cancérogènes (fibres minérales, substances à action hormonale, etc.) demeurent inconnus.

9.2.1 Génotoxicité

La mutagénèse indique le déclenchement du cancer seulement, pas nécessairement celui de la cancérogénèse complète.

Le déclenchement n'est que la première étape des phases multiples de la formation de la tumeur; il est suivi par la promotion (qui peut se faire en plusieurs phases) et enfin par l'évolution vers la tumeur maligne clinique. On ne croit pas que ces dernières phases impliquent des modifications génétiques, bien qu'une modification chromosomique puisse avoir lieu (Ramel, 1986).

On ne peut espérer que les analyses de la génotoxicité déterminent toutes les substances chimiques pouvant agir sur le processus complexe du développement tumoral, mais elles détermineront ceux qui établissent une modification génétique directe (principalement déclencheurs). Cela est valable pour les essais sur les rongeurs, qui ont tendance à ne déterminer que les substances chimiques qui sont des cancérigènes complets, capables à la fois du déclenchement et de la promotion de la tumeur.

Il est évident que la somme des résultats de deux systèmes de dépistage imparfaits devrait être supérieure à celle d'un seul système. Il semble y avoir consensus sur le fait que c'est sous cet angle qu'il faut envisager le rôle des essais à court terme à l'heure actuelle -- non en tant que remplacements. Dans ces termes, les tests de la salmonelle, des aberrations chromosomiques, de la réparation ADN, des transformations, qu'ils soient faits seuls ou en combinaisons sélectionnées à des fins précises, complètent utilement l'essai habituel sur les rongeurs. Ils sont surtout utiles (et largement utilisés par l'industrie) dans la présélection et la sélection des substances chimiques et des médicaments susceptibles d'être développés, pouvant être soumis à un essai sur les rongeurs. Ainsi, l'utilisation de tests à court terme a permis de réduire de manière importante l'expérimentation animale, en plus de permettre de réaliser des économies et de gagner du temps.

La plupart des seuils des tests de génotoxicité couramment pratiqués sont relativement bien compris; il semble probable que ces essais continueront d'être améliorés et raffinés au niveau de leurs capacités de dépister les agents génotoxiques qui, à leur tour, continueront de faciliter l'identification des cancérigènes possibles chez l'être humain (Lohman *et al.*, 1987) (Swierenga *et al.*, 1990).

Ces tests sont également utiles pour déterminer les voies métaboliques et faire d'autres études pratiques qui, à leur tour, permettent de rationaliser l'évaluation des risques et l'utilité des tests *in vitro* eux-mêmes. À cet égard, un autre usage qui présente un certain intérêt pour l'évaluation des risques est l'analyse de prélèvements humains (sang et produits d'excrétion) dans la recherche sur la mutagénicité.

L'un des problèmes inhérents aux conditions des tests de cultures est celui de la biotransformation inadéquate pour permettre l'activation des mutagènes indirects. L'utilisation d'une fraction microsomique hépatique (S9) a été très utile, mais elle ne réplique pas les conditions de l'animal entier. De récents progrès ont tiré parti de l'utilisation de techniques de perfusion du foie et de co-cultures. La mutagénèse est également déterminée chez l'animal entier par les analyses d'aberrations chromosomiques ou micronucléaires, pratiquées, en général, sur des cellules de la mœlle osseuse de souris ou d'autres rongeurs. Une modification très utile de l'essai des anomalies nucléaires pour les lésions à l'épithélium du côlon induites par des produits cancérigènes (Blakey *et al.*, 1985) a recours à des cellules de follicules pileux issues de biopsies cutanées pour constater les aberrations nucléaires (Schop et Goldberg, 1988). Ces deux tests ont été mis au point au Canada, et le dernier est actuellement soumis à une évaluation plus poussée.

9.2.2 Les relations entre la structure et l'activité (RSA)

Il s'agit d'aides *in vitro* engendrées par ordinateur à l'évaluation de la cancérogénicité possible des substances chimiques qui semblent jouer également un rôle précis, quoique limité, dans le problème complexe de l'identification précise des cancérigènes présents dans l'environnement et de l'estimation des risques de cancer. Cette méthode des RSA, en tant que méthode de remplacement de l'expérimentation animale, est utilisée en combinaison avec d'autres données sur les substances chimiques testées, comme procédure de présélection avant les essais *in vitro* et *in vivo*. Elle est particulièrement utile pour découvrir (sélection des candidats) les substances chimiques moins susceptibles d'avoir des effets toxiques ou inversement, pour sélectionner les substances chimiques les plus susceptibles d'avoir un effet particulier dans un milieu donné. Elle peut également servir à étudier les mécanismes toxiques au moyen de modifications structurales assistées sur ordinateur, et en observant les effets obtenus aux seuils toxiques modelés. Dans les études de la cancérogénèse, ce genre d'applications peut aider à évaluer les risques (ECETOC, 1986).

Dans sa mise à jour du *Red Book* de 1982, la FDA mentionne l'utilisation des RSA aux fins de sélection préalable. Bien que l'utilité de ces procédures soit jugée limitée, leur usage comme premier mécanisme général de sélection préalable est toujours préconisé.

La base de données parfois limitée sur laquelle un modèle peut être fondé, la tentation d'extrapoler au-delà des capacités du modèle et le «bruit» inhérent des essais sur lesquels les modèles sont fondés (Enselin, 1988), constituent quelques-unes des limitations que présentent les modèles RSA.

9.2.3 Les banques de données informatisées

La base de données EPA/IARC qui affiche les profils d'activité des tests à court terme a été développée pour évaluer l'information quantitative des essais multiples sur les produits toxico-génétiques. Elle devrait s'avérer utile dans l'évaluation comparative des risques puisqu'elle projette les résultats quantitatifs des analyses génétiques et connexes sous forme de «profil d'activité génétique» graphique, indiquant les doses efficaces les plus faibles et les doses inefficaces les plus fortes. Ces systèmes d'essais biologiques sont organisés en fonction des classes d'activité génétique et sous-divisés en fonction du niveau phylogénétique de l'organisme utilisé dans le test. Les profils sont fondés sur la mutagénicité de quelque 200 substances chimiques sur lesquelles on dispose de données relatives à leur cancérogénicité pour l'être humain. Lorsqu'on les utilise avec les renseignements issus des tests sur les animaux et des études épidémiologiques (Monographie suppl. 7, 1987, IARC), l'évaluation des risques que pose l'exposition à des substances chimiques pour la santé humaine est facilitée (Waters *et al.*, 1988).

9.2.4 Les substances cancérigènes non génotoxiques

Il a été noté à différentes reprises dans le présent rapport que de nombreuses substances en jeu dans le processus cancérogène ne sont pas génotoxiques (c'est-à-dire qu'elles n'exercent pas d'effets démontrables sur l'information encodée dans l'ADN). Les tests à court terme ont été fondés presque exclusivement sur les substances mutagènes, les estimations de risques étant dérivées à partir de modèles mathématiques théoriques.

Malheureusement, comme il a déjà été souligné, la grande valeur de prédiction résultant du fait que l'on peut montrer que presque toutes les substances chimiques mutagènes peuvent également être cancérigènes dans un certain modèle d'animaux (environ 90 pour 100), n'est pas valable dans la situation contraire. Ainsi, dans un certain nombre de cas, les substances chimiques non mutagènes se sont avérées cancérigènes chez les animaux. Cela est souvent dû au fait qu'elles exercent leur action par l'un ou l'autre de divers mécanismes non génotoxiques déterminant la promotion, la cancérogénèse à l'état solide, ou l'un ou l'autre de divers mécanismes hyperplasiques ou cytotoxiques, ou les deux, qui induisent des cancers de la vessie, des reins ou du foie.

Ce n'est que récemment que la fréquence et l'importance du rôle de ces agents non génotoxiques dans le processus cancérigène ont été reconnus. Aujourd'hui, il est devenu tout à fait évident qu'il est nécessaire de disposer d'un ensemble d'essais fiables pour définir la cancérogénicité possible de ces différentes catégories de cancérogènes non génotoxiques (Butterworth, 1987). Une telle définition doit, de toute nécessité, reposer sur des essais *in vitro* qui déterminent les seuils cytopathologiques et autres seuils propres au mécanisme cancérigène particulier concerné. Il s'agit d'un domaine de la mise au point de méthodologies pour les tests qui attire de plus en plus l'attention des centres américains et européens de recherche orientés principalement vers la toxicologie *in vitro*.

Ce besoin est d'autant plus évident qu'il est souvent difficile de démontrer sans équivoque les effets cancérigènes chez les rongeurs lorsque les tumeurs ont un temps de latence prolongé, par exemple dans le cas de l'exposition aux fibres, à de nombreux composés métalliques, à la saccharine, aux corps étrangers cancérigènes, etc.

9.3 Quelques positions et points de vue sur les politiques

9.3.1 Le Japon

Le Japon est un pays membre de l'OCDE, et les lignes directrices de l'organisation ont influencé ses exigences au niveau des règlements. Dans les amendements apportés en 1986 à la *Loi sur les substances chimiques* du Japon, deux tests de mutagénicité *in vitro* ont été adoptés à des fins de dépistage, soit un test de mutation réverse bactérienne et un test d'aberration chromosomique utilisant des cultures de cellules de mammifères. Des lignes directrices additionnelles concernant un test micronucléaire *in vivo* utilisant des rongeurs, ainsi que d'autres lignes directrices relatives à des périodes prolongées, ont été introduites en 1987,

et il a été déclaré qu'en général, ces lignes directrices ont été écrites conformément aux lignes directrices relatives aux tests de produits chimiques de l'OCDE (Annexe 1, *Toxicologie génétique*, pp. 471-474, mai 1983).

D'autres études sont actuellement financées par le ministère de la Santé et du Bien-être japonais et portent sur des tests de cytotoxicité et sur le développement de nouvelles méthodologies toxicologiques.

9.3.2 Les États-Unis : l'EPA et la FDA

Le *Red Book* mis à jour comprend un chapitre sur les tests de génotoxicité à court terme qui décrit et commente divers tests se rapportant à la cancérogénicité et à l'induction de dommages génétiques dont on peut hériter. La direction des aliments (Foods Directorate) de la FDA n'est pas prête à accepter les résultats des tests de toxicité *in vitro* au lieu de ceux sur les animaux pour faire l'estimation du risque génétique dont on peut hériter chez l'être humain, étant donné que l'on considère qu'il n'existe pas encore, en règle générale, de méthode de rechange acceptable. Les tests de génotoxicité *in vitro* seront donc principalement utilisés par cet organisme lorsqu'il est nécessaire de faire d'autres tests de toxicité pour évaluer les essais biologiques ambigus sur la cancérogénicité chez les animaux et pour enquêter sur les raisons pratiques de l'activité cancérogène.

La direction des aliments de la FDA dispose, en fait, d'unités de recherche de laboratoire en toxicologie génétique et *in vitro* internes qui travaillent activement à la réalisation de ces objectifs.

À l'instar de l'EPA, la FDA participe aux activités de recherche entreprises dans le cadre du National Toxicology Program (NTP). Dans ses laboratoires NIEHS de Research Triangle Park en Caroline du Nord, le NTP dirige un programme de recherche intra-muros considérable sur le développement de méthodes substitutives, notamment en toxicologie génétique. Une partie encore plus importante de ce programme de recherche concerne la sous-traitance de projets. Au cours de l'exercice 1988, le NTP a déclaré avoir alloué au développement et à la validation de méthodes *in vitro* 17,7 millions de dollars, soit 22 pour 100 de son budget total (IRCC, 1989).

La participation de la FDA au NTP comprend surtout la recherche menée au National Center for Toxicological Research (NCTR).

9.3.3 Quelques points de vue et commentaires du NIEHS/NTP

La direction de la toxicologie génétique et cellulaire des laboratoires du NIEHS-NTP s'intéresse presque exclusivement aux essais toxicologiques génétiques à court terme relatifs au cancer, à la fécondité et à la tératogénicité.

Les discussions avec les chercheurs des laboratoires de toxicologie *in vitro* du NIEHS-NTP ont donné lieu aux points de vue suivants sur le statut de la toxicologie génétique ainsi que sur les tendances auxquelles on peut s'attendre.

Au cours des dix dernières années, les essais sur la génotoxicité à court terme ont suscité l'enthousiasme et fait l'unanimité dans le milieu scientifique, en raison des économies qu'ils permettent de réaliser et du temps gagné. Cette période a été suivie d'une période de réévaluation -- de questionnement sur le meilleur moyen d'utiliser ces essais --, de pressions pour qu'ils soient validés, et d'interrogations sur les moyens à utiliser et à quelles fins les utiliser.

Près de 200 essais *in vitro* et *in vivo* à court terme ont été publiés. Aujourd'hui, on s'interroge :

- Qu'en pense-t-on?
- Comment devraient-ils être utilisés?
- Quelle approche est préférable -- système tridimensionnel ou batterie de tests, etc.?

Les résultats de ces tests doivent reposer sur des données pratiques, non sur des données théoriques, et ils doivent être soumis à une analyse critique. Il ne suffit pas d'identifier un groupe de substances cancérigènes chez la souris pour décider que ces substances sont également cancérigènes dans un essai *in vitro* donné. L'épreuve décisive est la suivante : cet essai permet-il la discrimination? Même si c'est le cas, le problème de sa transposition en termes humains demeure.

Il existe probablement 26 substances chimiques dont les effets cancérigènes chez l'être humain sont insuffisamment prouvés (IARC, 1987) et elles ne représentent pas un éventail adéquat des classes de substances chimiques. Il existe autant de lacunes, sinon plus, en ce qui concerne les agents prouvés n'être pas cancérigènes.

Cette tendance résulte de la non-utilisation de la méthode à vaste batterie de tests. On a indiqué qu'un seul test de la salmonelle et un test *in vivo* des aberrations chromosomiques ou nucléaires suffisait. Les résultats négatifs que donnent de nombreuses méthodes d'essai en usage ne peuvent être considérés comme étant prédictifs (voir aussi pages 18-20).

Les essais à court terme destinés à déterminer les effets cancérigènes non génotoxiques (fibres, métaux, hormones) constituent un problème majeur fréquemment rencontré. Les procédures de la toxicologie génétique ont été mises au point dans le cas des substances chimiques organiques qui interagissent au

niveau moléculaire avec l'ADN et ne conviennent donc pas. Notre manque de compréhension des mécanismes cancérogènes en jeu nous empêche de concevoir des tests de cancérigènes non génotoxiques à court terme.

Si des analyses de toxicologie génétique doivent être développées pour détecter les substances cancérigènes non génotoxiques, nous devrions les comparer aux substances chimiques organiques non génotoxiques connues pour leurs effets cancérigènes chez l'être humain. Le problème, c'est que l'on n'en connaît aucune avec certitude.

D'autres méthodes de toxicologie *in vitro* seraient plus appropriées. On devrait s'efforcer à l'avenir de concevoir des essais correspondant aux classes de substances chimiques.

Il ne convient pas de considérer les agents cancérigènes chez les rongeurs comme seules mesures de validation normales.

D'après l'ensemble des données actuelles, le test de la salmonelle est considéré comme le seul à avoir une valeur de prédiction raisonnable (une opinion qui ne fait pas l'unanimité, même au sein de l'organisme). Les tests des aberrations chromosomiques et nucléaires *in vivo* étaient également considérés comme offrant de bonnes possibilités de prédiction.

Pour développer un nouveau test et le valider, il faut pouvoir en démontrer les résultats sur un nombre égal de substances cancérigènes et de substances non cancérigènes. La validation devrait se faire en deux étapes, soit celle des tests de confirmation, et celle des tests de discrimination. Les preuves qu'un test est corroborant doivent également pouvoir montrer qu'il est discriminatoire. À cet égard, l'absence d'agents non cancérigènes fiables constitue un problème majeur.

On a estimé qu'un test de salmonelle positif avait une bonne valeur de prédiction, mais qu'on ne pouvait se fier à un test négatif (sauf lorsque la structure de la substance chimique est connue). Ce même jugement vaut probablement pour l'analyse de la génotoxicité à court terme de la mœlle osseuse et autres analyses de la génotoxicité à court terme *in vivo*. Cependant, à l'heure actuelle, le consensus semble pencher en faveur des résultats des essais à court terme *in vivo*.

10.0 Les directions en Europe

10.1 La recherche toxicologique in vitro

10.1.1 Les concepts

Au cours des dix dernières années, les toxicologues des secteurs industriel et universitaire de toute l'Europe occidentale ont manifesté une poussée d'intérêt à l'endroit de la toxicologie *in vitro* et du développement de méthodes d'essais utilisant moins d'animaux. Notons que, contrairement à la situation apparente au Canada, les chercheurs scientifiques responsables de la réglementation participent activement aux études de développement et de validation de ces méthodes. Les ministères de la Santé, de l'Environnement, de l'Agriculture, et des Sciences et de la Technologie de plusieurs pays de l'Europe occidentale participent activement à la recherche sur le développement des méthodes substitutives et aux études de validation, ou du moins les subventionnent, et ce en collaboration avec les scientifiques de l'industrie et des universités.

En Amérique du Nord, la toxicologie *in vitro*, à l'exclusion des études sur la mutagénèse, est pratiquée dans les laboratoires industriels, à un degré variable, aux fins de développement de produits. La recherche active dans ce domaine a cependant été réduite à un nombre relativement restreint de personnes. Les programmes canadiens de recherche sont généralement insuffisants, étant donné que tant au Canada qu'aux États-Unis, les efforts de recherche sont concentrés sur la discipline secondaire plus étroite et plus spécialisée de la «génotoxicité».

10.1.2 Les progrès récents

En Europe, la «toxicologie *in vitro*», ou «pharmacotoxicologie cellulaire» est un domaine de recherche qui connaît un essor rapide et qui bénéficie de l'appui du gouvernement et des industries. Dans de nombreux pays, dont la France, le Royaume-Uni, la Belgique, l'Italie et la Scandinavie, il existe des sociétés scientifiques expressément orientées vers cette discipline secondaire. Ces sociétés, en collaboration avec le gouvernement et l'industrie, parrainent des programmes de recherche, des ateliers et des cours de formation. Elles organisent également des études de validation entre-pays, appuient des banques de données, et lancent de nouvelles publications. La recherche en toxicologie cellulaire en Europe semble considérablement plus avancée qu'en Amérique du Nord.

L'impact croissant de ce domaine de recherche semble imputable à plusieurs facteurs, entre autres, les progrès récents des technologies biochimiques (y compris moléculaires) et des cultures cellulaires les avantages pratiques des systèmes *in vitro* pour les études de la toxicité et du métabolisme aux fins de développement de produits, notamment de médicaments (*voir* ci-après) la perception que ce type de recherche contribue au développement et à la mise en œuvre de méthodes substitutives pour remplacer l'expérimentation animale dans les essais sur la toxicité, et une réaction aux pressions exercées au niveau politique en

vue d'effectuer l'harmonisation des règlements d'Europe 1992, ainsi qu'à celles des puissants groupes de protection des animaux de plusieurs pays d'Europe occidentale.

Dans un certain nombre de pays européens, ces facteurs ont récemment provoqué des augmentations rapides de la disponibilité du financement gouvernemental consacré à la recherche de méthodes substitutives, ainsi qu'un encouragement réel face à de tels accomplissements. Le premier point est illustré par une annonce faite par le ministère fédéral de la Science et de la Technologie en mai 1989 dans la *Bundesanzeiger* (Gazette) de l'Allemagne de l'Ouest voulant qu'une somme pouvant atteindre 21 millions de DM soit mise de côté pour la recherche et le développement de méthodes *in vitro* et pour le perfectionnement et la validation de procédures visant à réduire le nombre d'animaux utilisé et le stress qu'ils subissent. Des projets de financement se doivent d'être le résultat d'efforts concertés de la part d'institutions publiques et de l'industrie; ces projets seront menés sous l'égide du programme du ministère de la Biologie et de la Biotechnologie appliquées. Au début, quatre domaines spécifiques de recherche ont été identifiés, à savoir : l'élucidation de la pharmacodynamique et de l'efficacité, particulièrement au niveau du système nerveux central, la mise au point de modèles d'infection pour l'évaluation de nouveaux traitements (agents thérapeutiques), la recherche en oncologie pour la mise au point de nouveaux agents cytostatiques et de régimes thérapeutiques et pour l'étude des mécanismes des métastases, les procédures d'évaluation des effets locaux et généralisés des substances toxiques (*FDR Bundesanzeiger*, 27 mai 1989, n° 96, p. 2583).

Il semble probable que les programmes européens de recherche en toxicologie cellulaire auront une influence considérable sur la formulation des futures lignes directrices concernant les tests de toxicité élaborées par les organismes de réglementation européens.

10.2 Les instituts de recherche européens[1]

Les programmes de trois unités de recherche européennes actives dans le domaine des essais *in vitro*, du développement de méthodes, et des études de validation, sont décrits pour corroborer l'affirmation concernant leur niveau de perfectionnement relativement avancé. Ces laboratoires se trouvent en France, en Suisse et en Allemagne de l'Ouest respectivement, et leur programmes seront étudiés de manière assez détaillée. Nous avons visité les instituts français et suisse en décembre 1988, et plus tard l'unité de l'Allemagne de l'Ouest.

---

[1] L'auteur désire remercier S. Swierenga pour son assistance lors des visites effectuées dans deux des trois instituts européens (France et Suisse). M. Swierenga, chercheur scientifique auprès du Bureau de recherche sur les médicaments, était à l'époque savant invité au CIRC de Lyon, en France.

10.2.1 La France

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)
Unité 49 - Unité de Recherches Hépatologiques
35033 Rennes Cédex - France

Directeur de recherche : André Guillouzo

Cette unité travaille au développement de méthodes *in vitro* pour les études sur la toxicité et le métabolisme des médicaments, en se fondant sur des résultats obtenus *in vivo*. Elle dispose actuellement de 40 essais rapides et automatiques sur la toxicité et la fonction biochimique et elle est en train de développer un processus de dépistage systématique de trois jours, utilisant environ dix de ces essais.

Les études pratiques cherchant à déterminer les types de lésions induits par les médicaments sont aussi effectuées.

Voici certains des tests de dépistage utilisés :

- Fuite LDH (analyse de la lésion membranaire, intracellulaire et extracellulaire);
- Sécrétion d'albumine (test fonctionnel);
- Critères morphologiques (critères de calcul normalisés);
- Analyse GST (glutathione S transférase);
- Rouge soudan 0 (induction des lipides);
- Rouge neutre (lésion membranaire);
- Bleu de tétrazolium (lésion mitochondriale);
- Induction d'isozymes P450;
- Captation d'acides aminés (synthèse protéique);
- Techniques automatisées de fluorescence (pour plusieurs essais).

Les travaux de cette unité sont largement utilisés par l'industrie pharmaceutique sous forme de tests systématiquement effectués à contrat aux fins de développement de produits, au point qu'une entreprise distincte a été créée en 1987 (Biopredec) et se consacre exclusivement aux travaux de recherche à contrat sur les effets toxicologiques et pharmacologiques de nouveaux composés.

Le succès du programme de recherche de l'INSERM est attribuable au fait que les problèmes traités se rapportent explicitement à l'évaluation du risque pour l'être humain. Parmi les problèmes traités, citons :

- Les méthodes de culture à long terme d'hépatocytes humains et d'étude du métabolisme fonctionnel des médicaments, ainsi que les méthodes pour l'utilisation des hépatocytes humains cryoconservés.

- Le problème du polymorphisme génétique humain dans le métabolisme des médicaments (et donc la susceptibilité au risque) -- des lots d'hépatocytes sont classés selon leur «normalité» en évaluant leur capacité de métaboliser

quatre médicaments spécifiques et par comparaison avec des phénotypes humains. Par exemple, la détermination des espèces les plus pertinentes (au niveau du risque pour l'être humain) destinées à l'expérimentation animale avec un médicament particulier, en comparant l'activité métabolisante des hépatocytes de différentes espèces, c'est-à-dire chez le rat, le chien, le lapin, le singe et l'être humain.

À la suite de ces études, le groupe a signalé l'existence de nombreuses différences entre espèces au niveau du métabolisme des médicaments.

Exemples d'activités de recherche :

- Comparaison de la présence et de l'inductibilité des enzymes métabolisantes de médicaments dans les hépatocytes de culture par opposition aux hépatocytes de foies intacts.

- Métabolisme de médicaments spécifiques, étudié par la méthode HPLC et analysé par spectrométrie de masse.

- La co-culture d'hépatocytes de diverses espèces et de cellules épithéliales de foie de rats indifférenciées a rendu possible la réalisation d'expériences de longue durée. Les études de la toxicité chronique ont été conçues en se fondant sur l'addition quotidienne d'un médicament donné sur une période de deux à trois semaines.

- Un projet est en cours dans le but d'étudier l'expression oncogène dans la transformation cellulaire *in vivo* et *in vitro*, ainsi que l'induction d'oncogènes spécifiques pendant la régénération hépatique, l'isolement cellulaire et la culture de cellules. Ces études fournissent d'importants renseignements pratiques sur le développement d'analyses *in vitro* des substances cancérigènes.

Le directeur de recherche coordonne actuellement une étude de validation de tests de dépistage et de cytotoxicité parrainée par l'INSERM et les laboratoires. Elle consiste en l'étude de 30 composés codés menée dans six laboratoires (trois laboratoires de compagnies pharmaceutiques, trois laboratoires du gouvernement). Le dépistage se fait au moyen d'hépatocytes de rats et de chaque composé testé à raison de cinq différentes concentrations. Les tests à valider sont les tests de morphologie, de la LDH intracellulaire et extracellulaire, du rouge neutre, du bleu de Coomassie et du bleu de tétrazolium.

L'unité a participé activement à la promotion de méthodes substitutives *in vitro*, au moyen d'activités de relations publiques, d'ateliers et d'une collaboration avec d'autres groupes internationaux. Le directeur a prédit qu'en Europe, les tests d'hépatoxicité *in vitro* feront partie des lignes directrices sur la toxicité d'ici quatre ans. Il est l'un des directeurs et l'un des membres fondateurs de l'European Research Group for Alternatives in Toxicity Testing (ERGATT), et il participe activement à l'établissement et à la promotion de la banque de données toxicologiques *in vitro* de l'ERGATT.

10.2.2 La Suisse

Institut de toxicologie
Département de biologie, Institut féderal de technologie et Université de Zurich
CH8702 Schwerzenbach, Suisse

Directeur : Gerhard Zbinden

M. Zbinden est actuellement l'un des porte-parole les plus connus au niveau international dans le domaine de l'évaluation critique et de l'amélioration des méthodes utilisées en toxicologie, notamment les méthodes de remplacement utilisant moins d'animaux, voire aucun. Son unité de recherche comprend une quarantaine de membres du personnel, dont la plupart utilisent des techniques *in vitro*. Les chercheurs se consacrent au développement de tests de toxicité *in vitro* et ne font que des expérimentations animales rapides et non létales.

Leur but principal n'est pas de remplacer l'utilisation d'animaux en soi, mais de développer de meilleurs modèles, plus valables, au niveau biochimique.
M. Zbinden a cité le contrôle de lots d'insuline en exemple : les anciens lots étaient testés au moyen d'un test des convulsion utilisant environ 600 souris par échantillon, tandis que les nouveaux tests récemment développés et adoptant la méthode HPLC n'utilisent pas d'animaux (Trethewey *et al.*, 1986). Ce test est nettement plus sensible, au point où les formes humaines et animales de l'insuline peuvent être distinguées.

Les tests sur des animaux améliorés et pratiqués à l'institut sont des tests de toxicité aiguë réalisés avec des doses non létales, par exemple au moyen du contrôle (dans la cage) de l'activité motrice et du dépistage de la néphrotoxicité d'après l'examen des urines.

Des projets de recherche sont entrepris dans les domaines suivants :

- Tests de cytotoxicité (méthodes de remplacement possible du test de Draize) : un test rapide automatique à l'aide de colorants fluorescents et de l'analyse par cytométrie de flux a été développé; il mesure les déplacements dans la rétention du colorant (fluorescéine) et l'exclusion du colorant (bromure d'éthidium) après le traitement chimique. Cet test utilise des thymocytes de rat et il est plus rapide et sensible que les essais d'exclusion de colorants d'usage; de plus, il est quantifiable.

- Test fonctionnel cellulaire pour utilisation dans les études de développement de produits.

- Tests de neurotoxicité : cultures de réagrégats de tissus nerveux de poulet prenant pour seuils les modifications protéiques associées, morphologiques, pH et microtubulaires.

- L'hépatotoxicité : des méthodes ont été développées pour faire une analyse rapide automatique de l'hépatotoxicité après le traitement chimique *in vitro*. Au moyen de la cytométrie de flux, les contenus protéiques et ADN pourraient être mesurés de façon rapide et précise. Les systèmes de co-cultures (avec des cellules épithéliales de foie de rat) sont utilisés pour maintenir l'activité des enzymes métabolisantes *in vitro* pendant des périodes prolongées.

- Les marqueurs cellulaires des événements cancérigènes : ces essais rapides permettant de détecter, dès le début, les marqueurs cellulaires, dans le cas des événements néoplasiques, sont effectués par cytométrie de flux. Les fibroblastes de rat sont utilisés pour déterminer les modifications induites par les agents chimiques dans la cinétique cellulaire (déplacement de la phase G0 à la phase G1 du cycle cellulaire), ainsi que les analyses du ratio nucléaire et cytoplasmique. Cet essai permet de détecter *in vivo* et *in vitro* l'activité promotrice du cycle cellulaire par les substances chimiques dans les cellules non proliférantes. Le phénobarbital, par exemple, était actif dans cet essai. L'essai permet de repérer rapidement les agents qui endommagent les cellules fusiformes et les chromosomes.

- L'essai de la poche granulomateuse : un essai *in vivo* -- *in vitro* a été développé à l'aide de la technique de la poche granulomateuse, technique originalement développée à l'Université de Montréal et induite en injectant de l'air dans les tissus conjonctifs sous-cutanés de rats (Selye, 1952). Les substances chimiques utilisées dans ce test sont injectées soit dans la poche, soit systémiquement, en utilisant comme cibles les cellules de revêtement dérivées du mésenchyme. Divers événements mutagènes, y compris les mutations induites *in vivo*, peuvent être mesurés dans la même population de cellules cibles. Les seuils utilisés comprennent le test de mutation *in vitro* (résistance de la tioguanine), et la croissance dans de la gelose. Il s'agit d'un essai biologique relativement rapide et polyvalent qui utilise moins d'animaux (Maier, 1984).

L'utilisation de la poche granulomateuse dans le but de détecter, peu après le traitement cancérogène, l'oncomoduline protéique fixatrice de calcium et spécifique à la tumeur, est toujours en phase expérimentale. Il s'agira d'un marqueur *in vitro* particulièrement utile, puisqu'il s'agit d'une propriété spécifique à la tumorigénicité et non d'une propriété générale accompagnant l'induction d'une tumeur, comme c'est actuellement le cas avec de nombreux oncogènes marqueurs moléculaires.

M. Zbinden a souligné que cette recherche biomédicale fondamentale en cours touche, dans une large mesure, les mécanismes biologiques aux niveaux cellulaire et moléculaire. Dans de très nombreux cas, elle se prête davantage aux méthodes *in vitro* qu'aux études d'animaux entiers. De plus, «le prestige conféré par les réussites scientifiques s'est nettement déplacé vers les exploits techniques au niveau moléculaire, ce qui est tout à l'avantage des animaux de laboratoire». On retrouve cette même tendance dans la fabrication et le contrôle de la qualité des produits biologiques, grâce aux progrès rapides dans la culture cellulaire, aux

méthodologies de recombinaison ADN, aux économies d'argent et à l'encouragement au niveau de la réglementation.

Les progrès réalisés pour éliminer l'expérimentation animale ont été bien plus lents dans le domaine du développement des produits en raison des habitudes, de la dépendance envers les données historiques, du faible appui financier et du peu de prestige dont jouit la recherche de méthodes de remplacement (Zbinden, 1988).

10.2.3 L'Allemagne de l'Ouest

Le Bureau des produits chimiques
Max Von Pettenkofer Institut des Bundesgesundheitsamtes (BGA)
Bureau de la Santé de la République fédérale d'Allemagne
Berlin-ouest

Directeur : D. Kayser

Cet institut fait partie du système de recherche du ministère de la Santé de la République fédérale d'Allemagne (BGA). L'unité de M. Kayser est également responsable des lignes directrices régissant la réglementation sur les produits chimiques. Les additifs alimentaires et les pesticides sont soumis à des enregistrements distincts, tout comme les médicaments et les produits biologiques.

Le Bureau des produits chimiques est doté d'un groupe de travail permanent attaché à la mise à jour des méthodes toxicologiques. Ce groupe entreprend actuellement une étude de validation d'un protocole DL50 modifié assez semblable à celle du test à dose fixe faite par l'OCDE dans un autre pays d'Europe avec le Royaume-Uni en tête. L'étude du BGA est relativement restreinte; seulement cinq laboratoires industriels et le BGA lui même y participent. Un rapport d'épage sur cette étude a été déposé à l'atelier de l'OCDE qui s'est tenu à Bruxelles en septembre 1989 (page 29). M. Kayser prévoit qu'une nouvelle méthode permettant de tester la toxicité aiguë des substances chimiques sera autorisée au début de 1990 au sein de la communauté européenne. Une présentation de l'Allemagne à la CCE exigerait l'usage d'une DL50 approximative pour tester les produits pharmaceutiques.

Les règlements de l'Allemagne de l'Ouest en ce qui concerne les tests des produits chimiques stipulent déjà que lorsqu'une méthode d'expérimentation n'utilisant pas d'animaux est disponible et acceptable, elle doit être utilisée. Une étude de validation plus poussée concernant un test de l'anneau visant 15 laboratoires (dix de l'industrie et cinq des universités) est en cours pour évaluer le test CAM d'embryon de poulet, au moyen d'une incubation de huit jours et de tests de cytotoxicité au bleu kenacide et au rouge neutre comme remplacements de l'essai de Draize. Ce test utilisera 44 substances au cours d'une période de deux ans et demi et coûtera plus de trois millions de DM (environ deux millions de dollars canadiens).

L'institut lui-même est relativement petit et son programme de recherche se limite essentiellement aux études de méthodologies liées aux programmes de validation.

Une de ces études a permis de faire des recommandations de nouvelles lignes directrices concernant les essais sur les effets irritants pour la peau (Schlede *et al.*, 1989).

M. Spielman, dont la recherche porte sur les effets toxicologiques sur la reproduction, est responsable de la coordination du programme de validation de Draize. Il travaille également avec des cellules souches embryonnaires (en co-culture avec des fibroblastes) prises comme modèle de test des tératogènes. M. Spielman a récemment été nommé à la direction d'un organisme central de l'Allemagne de l'Ouest, le Zentralstelle ur Erfassung und Bewertung von Tierversuchen (Bureau central d'enregistrement et d'évaluation des expériences faites sur les animaux). Établi à Berlin, cet organisme compilera et diffusera de l'information sur les nouveautés en matière de procédures toxicologiques.

Les pressions exercées par les groupes de protection des animaux, qui ont entraîné à leur tour des pressions politiques, ont été très fortes en Allemagne de l'Ouest. À partir de 1989, les expérimentations animales seront interdites dans les tests de produits cosmétiques, de savons et de détergents. Par conséquent, les industries de l'Allemagne de l'Ouest, comme la société Henkel, ont consacré et sont prêtes à consacrer énormément d'argent et d'efforts au développement d'essais *in vitro* comme méthodes substitutives aux essais de Draize, aux études de simulation, etc.

10.2.4 La collaboration à la réglementation

Dans la communauté européenne, les organismes de réglementation internationaux et nationaux (OCDE, CEC, etc.) ont participé activement au développement et à l'acceptation de «méthodes substitutives» aux fins de réglementation des médicaments et autres substances chimiques.

Une telle acceptation fait l'objet d'une harmonisation internationale suivant bien son cours dans la communauté européenne, mais au-delà de la CEE, les progrès sont plus problématiques et incertains.

Le président du Comité des produits médicinaux de marque de la Communauté économique européenne, qui est également le directeur de l'institut des médicaments du Bundesgeshundheitsamt (BGA) de la République fédérale d'Allemagne (RFA) a décrit comme suit les différentes étapes de la présentation d'une méthode substitutive afin d'en obtenir l'autorisation réglementaire au niveau international :

1) Les recommandations faites par les chercheurs scientifiques sont étudiées par des collègues. (En l'absence de recommandations scientifiques, les groupes de protection des animaux se sont chargés d'en faire.)

2) L'évaluation des recommandations peut entraîner un financement sur une base nationale (en RFA, cela concerne souvent les organismes et scientifiques chargés de la réglementation).

3) À la suite de l'examen scientifique de la logique et de l'utilité de la méthode recommandée, les décisions à prendre concernant son applicabilité au niveau réglementaire exigeront souvent de faire des «études de collaboration» (financées, organisées et réalisées par des organismes de réglementation ou par leur intermédiaire) qui pourront amener l'acceptation nationale.

4) Une fois les étapes de la validation et de l'acceptation nationale passées, les exigences d'harmonisation des tests nécessitent la conclusion d'entente internationale sur l'utilisation de la «méthode substitutive» (Bass, 1988).

Il est évident qu'il n'existe aucun raccourci pour obtenir la validation et l'acceptation d'une méthode, même avec la participation active et la bonne volonté de toutes les parties concernées.

Des progrès considérables peuvent être faits, et tel est le cas chaque fois que l'organisme de réglementation fournit une participation appréciable. Les départements scientifiques du National Institute for Biological Standards du Royaume-Uni en donnent l'exemple. Cet institut accorde une grande priorité aux travaux orientés vers le développement de produits biologiques sans expérimentation animale. Ses activités sont centrées non seulement sur le développement de nouveaux tests n'utilisant pas d'animaux, mais aussi sur la collaboration internationale par l'intermédiaire de l'OMS, de la CEE et d'autres organismes, ainsi que sur la collaboration avec l'industrie, dans le but d'établir des méthodes acceptables pour tester systématiquement les produits commerciaux.

L'institut a récemment réalisé des progrès notables dans les domaines de recherche suivants :

- méthodes substitutives *in vitro* visant à contrôler la qualité des produits biologiques;
- détection de pyrogènes par libération de lymphokine comme remplacement du test pyrogène du lapin;
- test *in vitro* de glycoprotéine rabique comme remplacement du test NIH utilisant des souris vivantes;
- test sur la neurovirulence des vaccins antipolio fondé sur la détermination de la mutation en jeu dans l'altération du virus.

Ces études faites par G.C. Schild et ses collègues ont reçu une mention spéciale en 1988, lors de la remise du Prix de l'industrie pharmaceutique européenne pour leur importante contribution au développement de nouvelles méthodes substitutives (Roberfroid, 1988).

10.3 Autres initiatives européennes

10.3.1 Les activités des associations industrielles

Les organisations industrielles comme l'European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre (ECETOC) et l'European Federation of Pharmaceutical

Industries Association (EFPIA) appuient sans équivoque le développement et l'utilisation de protocoles de tests efficaces qui réduisent ou remplacent l'utilisation d'animaux (Cano, 1988). Les activités de ces organisations reflètent les politiques et les intérêts de leurs sociétés membres en matière de recherche et de développement sur les produits et l'innocuité. Ces dernières années, l'accent a été placé sur la nécessité d'harmoniser les exigences concernant les règlements sur les tests et, simultanément, sur la recherche de remplacements. Les organisations coopèrent activement au niveau scientifique avec la CEC, l'OCDE et d'autres organismes gouvernementaux et intergouvernementaux.

La série de monographies produite par les groupes de travail composés de spécialistes venant de la vaste communauté scientifique industrielle européenne, monographies disponibles au secrétariat par l'intermédiaire de ses sociétés membres, est l'une des activités les plus évidentes de l'ECETOC. Des experts dans le domaine ont également été consultés. Plusieurs de ces monographies nous ont utilement servi de matériel de référence dans le cadre du présent rapport et des annexes.

L'établissement en 1986 d'un prix bisannuel de 25 000 Francs suisses alloué à la recherche menée en Europe est l'une des activités les plus notables de l'EFPIA. Le sujet choisi pour les deux premiers concours a été le même, c'est-à-dire «Méthodes substitutives à l'expérimentation animale». Le directeur général de l'EFPIA a déclaré que cette répétition du sujet répondait en partie aux propres vœux de l'industrie, cherchait en partie à compléter les travaux entrepris par le Conseil de l'Europe et de la CEE en ce domaine, et répondait en partie aux intérêts du public et des parlements. Quelles qu'en soient les raisons, cette répétition témoigne certainement du profond intérêt que portent les chercheurs scientifiques industriels ou les chercheurs chargés de la réglementation de l'Europe au développement de méthodologies *in vitro*.

Le directeur général de la Direction de la sécurité nucléaire et de la protection du consommateur et de l'environnement de la CEE (DG XI) a décrit les défis auxquels font actuellement face les organismes de réglementation européens, précisant qu'ils doivent continuer de financer la recherche de méthodes de rechange et de fournir un moyen d'évaluation et de validation de ces méthodes au besoin (Brinkhorst, 1988).

Il s'agit d'un défi et d'une responsabilité que les organismes canadiens de réglementation ne semblent pas avoir reconnus.

10.3.2 Les banques de données

Certaines organisations, comme le Fund for the Replacement of Animals in Medical Experimentation (FRAME) dont le siège social se trouve au Royaume-Uni, et sa contrepartie, l'European Research Group for Alternatives in Toxicology Testing (ERGATT), sur le continent, sont orientées professionnellement à remplir des programmes bien établis et très constructifs.

Parmi ces organisations, le FRAME est connu et respecté au niveau international. Fondé au milieu des années 1960, le FRAME publie le journal scientifique ATLA, parraine et coparraine des rencontres nationales et internationales, et a établi, entre autres nombreuses activités, la banque de données pharmacologiques *in vitro* qui s'est avérée une source d'information spécialisée utile pour les chercheurs scientifiques.

Récemment, une organisation comparable au FRAME, mais de type multinational, est apparue sur le continent européen. Le European Research Group for Alternatives in Toxicology Testing (ERGATT) travaille en étroit contact avec le FRAME et a établi une autre banque de données, cette fois en rapport avec les techniques de toxicologie *in vitro*. On peut avoir accès aux deux banques en écrivant au FRAME, Eastgate House, 34 Stoney Street, Nottingham, UK NG1 1NB.

Assistance aux animaux, une association française de protection des animaux, a commencé en 1988 à établir un centre de ressources sur les méthodes substitutives. Ce centre appelé CIDOMS (Centre d'information et de documentation sur les méthodes substitutives) fournira des renseignements sur la réglementation internationale et sur les questions d'ordre technique, en plus de dépouiller de la documentation.

L'Académie pour la protection des animaux, une organisation de protection des animaux de l'Allemagne de l'Ouest, semble également avoir un programme constructif en cours. Cette organisation possède son propre laboratoire de cultures cellulaires aux fins de recherche en toxicologie *in vitro* et elle a établi, en 1986, une banque de données sur les méthodes substitutives qui compte aujourd'hui plus de 3 600 entrées sur les expériences et procédures d'essais utilisant des animaux ainsi que leurs méthodes de remplacement possible; il est possible d'en obtenir un exemplaire en trois volumes par l'intermédiaire de l'Akademie fur Tierschutz; Spechtstr. 1, D801 Neubiberg, Allemagne de l'Ouest.

10.3.3 Les études d'évaluation et l'aide à la recherche

En plus d'avoir participé à l'établissement de deux banques de données et à la publication d'un journal -- tel que mentionné précédemment -- le FRAME est activement engagé dans un effort continu pour faire appliquer des méthodes toxicologiques substitutives validées à la rationalisation des lignes directrices des tests. Pour atteindre ce but, le comité de la toxicologie du FRAME travaille actuellement sur un important rapport dont la publication est prévue à l'occasion d'une conférence internationale parrainée par le FRAME qui se déroulera à Londres, au Royaume-Uni, en 1990.

Il est intéressant de noter que les recommandations contenues dans le premier rapport du comité de toxicologie du FRAME ont été intégrées presque en totalité dans le chapitre sur les méthodes substitutives à l'expérimentation animale du rapport de l'OTA (1986) comme liste des tendances actuelles (Balls, 1987).

En Suède, le Nordiska Samfundets Stiftlse For Vetenskaplig Forskning Utan Djurforssk (Fonds pour la recherche scientifique sans expérimentation animale) sollicite les projets de recherche en toxicologie *in vitro* des scientifiques biomédicaux scandinaves en vue de les financer. Son programme appuie de dix à 15 projets scientifiques au coût d'un million de SEK environ (près de 200 000 dollars canadiens). En 1988, 14 des 45 demandes de subventions présentées ont été accueillies favorablement. Le fonds participe également à un projet de validation des études de toxicologie aiguë.

En 1988, la Suède a promulgué plusieurs nouvelles lois sur la protection des animaux, l'un des objectifs étant de contrôler l'expérimentation animale. À cette fin, l'acceptation par un comité déontologique sera nécessaire, ce qui augmentera sans aucun doute les pressions en faveur de la recherche et de la validation de méthodes dans ce pays, réduisant au maximum l'utilisation d'animaux ainsi que la souffrance qu'ils subissent.

Au Royaume-Uni, des organisations modérées de protection des animaux, entre autres la Royal SPCA, travaillent en étroite collaboration avec le FRAME et laissent cette organisation s'occuper de la plupart des activités liées aux méthodes substitutives. La Royal SPCA s'occupe plus particulièrement de promouvoir l'amélioration des techniques existantes et elle a récemment commencé des ateliers visant à examiner et à recommander des méthodologies améliorées à de telles fins. Celles-ci seront publiées deux fois par an dans le journal *Laboratory Animals* -- un autre exemple des avantages que revêt la collaboration par rapport à la confrontation.

Le Royaume-Uni compte au moins quatre fonds fiduciaires de recherche qui sont prêts à accorder une aide financière (et qui, dans certains cas, sont entièrement consacrés à cette fin) aux projets de recherche, de développement et de validation généralement réalisés dans des universités et qui réduiront, amélioreront ou remplaceront l'utilisation d'animaux dans la recherche et les essais. Ces fonds de recherche sont :

- Le Dr Hadwen Trust For Humane Research, 46 Kings Road, Hitchin, Herts.
- Humane Research Trust, 62 Bramhall Lane South, Bramhall, Cheshire.
- Lawson Tait Medical & Scientific Research Trust, 51 Harley Street, London W1.
- Lord Dowding Fund for Humane Research, 51 Harley Street, London W1N 1DD.

11.0 Les activités au Canada

11.1 Les laboratoires de la Direction générale de la protection de la santé

11.1.1 Le Bureau des produits biologiques

Les laboratoires du Bureau comptent parmi les quelques laboratoires du gouvernement canadien chargés d'effectuer les tests toxicologiques systématiques intra-muros. Ce bureau effectue des séries de tests sur les vaccins et autres produits biologiques destinés à la distribution nationale et étrangère. La production commerciale canadienne de vaccins antipolio, contre la rage et la fièvre jaune, entre autres, est assez considérable.

Les produits injectables doivent être soumis à des tests visant à en étudier les effets pyrogènes. Les tests pyrogènes ont toujours permis de mesurer les modifications de la température chez les lapins à la suite d'une injection de la substance testée. Une méthode substitutive *in vitro* utilise les amébocytes de la limule, qui sont lysés en présence de pyrogènes (test LAL).

Le Bureau des produits biologiques utilise habituellement le LAL sauf dans le cas des interférons. Le test de dépistage chez le lapin est plus sensible aux pyrogènes présents dans les interférons, donnant parfois une réaction positive alors que le LAL est négatif. Le Bureau effectue des essais parallèles sur les interférons au moyen des deux méthodes. Dans ce cas, il semble que le lapin soit hypersensible, captant les facteurs pyrogènes innés «inoffensifs» (probablement dérivés de substances pyrogènes comme l'interleukine II). Espérons que ces données montreront que le LAL est une méthode d'évaluation de l'innocuité de l'interféron aussi satisfaisante qu'elle l'est pour d'autres produits biologiques injectables.

Les chercheurs de la Division des produits virologiques poursuivant des travaux ayant pour but (1) de modifier un test ELISA et de l'appliquer au vaccin antipoliomyéle inactif (vaccin Salk) en remplacement du test d'activité realisé sur le rat et (2) d'utiliser une lignée cellulaire humaine (HEP2) au lieu de cultures primaires de rein de singe pour tester les isolats provenant de cas cliniques de poliomyélite en vue de déterminer si ces cas sont attribuable au vaccin ou à une souche virale sauvage. Un singe doit être tué chaque fois que l'on veut obtenir des cultures primaires.

Les tests de neurovirulence sont pratiqués sur des singes macaques pour étudier les effets des vaccins antipolio administrés par voie orale. Depuis 1980, on utilise moins de primates qu'auparavant pour cette procédure (42 au total comparativement aux 135 requis dans les anciennes méthodes, pour les tests et les contrôles sur trois souches du virus de la polio concernées). Cette méthode de test modifiée a obtenu un acceuil favorable à la suite des études réalisées conjointement par le Royaume-Uni, les États-Unis et le Canada (Contreras, 1987). Bien que la recherche se poursuive, il semble peu probable de trouver une méthode substitutive acceptable ou de réduire grandement le nombre d'animaux dans l'immédiat (cinq ans ou plus). Il n'est pas déraisonnable d'espérer que

l'avancement rapide de nos connaissances sur les génomes viraux concernés permettront de déterminer à l'avenir des seuils biochimiques et génétiques démontrables au moyen de tests *in vitro*. Malheureusement, au Canada, il est souvent très difficile d'obtenir des fonds pour ce genre d'activités de recherche et de développement appliquées par les voies habituelles «d'aide à la recherche» (page 80).

Quant aux autres vaccins actuellement testés sur les animaux, celui de la rage est soumis au test intracérébral de la souris du NIH; on dit qu'il existe actuellement peu de chances de lui trouver un substitut efficace. L'activité du vaccin de la fièvre jaune a déjà fait l'objet de tests chez la souris. Toutefois, un projet conjoint du Bureau et des Laboratoires Connaught a récemment validé un test de culture de tissus (essai sur plaque), lequel est maintenant officiellement accepté comme le test canadien d'activité du vaccin de la fièvre jaune, à des fins de réglementation. Un projet semblable de remplacement *in vitro* du test d'innocuité de l'adénovirus est entrepris par le même groupe de chercheurs du Bureau, cette fois sans la collaboration de l'industrie.

La recherche continuelle (dépistage) d'agents exogènes qui doit être faite pour toutes les substances biologiques a recours à des méthodes utilisant à la fois des animaux et la culture de tissus. Les données comparatives tirées de ces tests sont soumises à un examen continu du Bureau (et d'autres organismes semblables dans d'autres pays) dans le but d'adopter des méthodes de culture si elles s'avèrent être de bons prédicteurs de la somme considérable de données surtout négatives compilées à partir de ces types de tests systématiques du contrôle de la qualité.

Cette description des activités du Bureau est encourageante, sur le plan de l'efficacité, de l'économie et de la conservation des animaux de laboratoire. Toutefois, il existe un revers à la médaille, et ce revers concerne les rétrovirus. Des phénomènes récents, notamment l'apparition et la propagation du virus du SIDA, ont rendu essentiel le dépistage complet des rétrovirus lents pour tous les substrats et agents biologiques utilisés dans les produits injectables. Ce qui se traduit en «nouveaux» tests parallèles minutieux réalisés *in vitro* ainsi que sur des animaux pour détecter la présence ou constater l'absence du virus, et dans le cadre des études d'efficacité des méthodes comparatives.

11.1.2 Le Bureau de recherche sur les médicaments

Le Bureau de recherche sur les médicaments compte plusieurs sections qui ont recours aux procédures *in vitro* dans le cadre de la recherche et de l'évaluation. La section de toxicologie génétique du Bureau travaille principalement à appliquer des tests de toxicologie *in vitro* aux problèmes concernant l'aspect de la réglementation de la Direction des médicaments. La section participe activement aux travaux entrepris par la US Pharmacopea (USP) et se penche actuellement sur la faisabilité d'adapter l'essai «Microtox» (basé sur la réactivité de la bactérie à des substances toxiques) à l'évaluation de l'innocuité de médicaments (Matula *et al.*, 1990). Cette section participe également à la normalisation des allergènes de la moisissure, ce qui assure les connaissances scientifiques fondamentales et les normes de référence des extraits d'allergènes. Ces travaux serviront finalement à

l'élaboration de règlements sur les préparations commerciales vendues pour les traitements de sensibilisation. Diverses méthodes *in vitro* ont été mises au point afin de mesurer l'activité allergène de ces extraits (Vijay *et al.*, 1989).

Les chercheurs orientent maintenant leurs efforts vers la production d'anticorps monoclonaux et les méthodes de clonage de gènes qui permettront de mieux comprendre la structure de ces allergènes.

Au cours des dernières décennies, un second laboratoire de cette section s'est voué en grande partie à la toxicologie (génétique et cellulaire) *in vitro* sur des cellules de mammifères. Le programme de recherche de ce laboratoire comprend également la mise au point de méthodes et l'élucidation des mécanismes mis en jeu dans les tests *in vitro* pour les promoteurs de tumeurs et les cancérigènes non génotoxiques (pour une revue, consulter Swierenga, 1985). L'accent a surtout été placé sur le rôle de la cytotoxicité dans le processus de transformation (Swierenga *et al.*, 1990b,c) et sur l'adaptation de tests *in vitro* aux systèmes primaires de cellules épithéliales humaines.

Le Programme national de recherche et développement en matière de santé (PNRDS) subventionne un projet conjoint d'une durée de trois ans auquel participent ce laboratoire de toxicologie *in vitro* et des chercheurs de la Faculté de médecine de l'Université Laval et qui vise à établir des lignées d'hépatocytes humains. Ce projet a permis l'isolement et la culture de quatre lignées cellulaires bien caractérisées qui sont maintenant disponibles et qui sont utilisées par d'autres chercheurs (Swierenga *et al.*, 1990d).

Une autre étude, effectuée avec le département de pathologie de l'Université d'Ottawa, porte sur l'identification et l'utilisation de marqueurs de la cytokératine en cancérogénicité-toxicité (Swierenga *et al.*, 1990b).

Ce laboratoire touche depuis peu à un autre domaine de recherche, soit l'application de techniques de génétique moléculaire à la définition des mécanismes anticancer des médicaments utilisés en chimiothérapie. (C'est la Section de biotechnologie qui travaille maintenant à ce projet.)

Le chercheur principal du laboratoire de cellules de mammifères a également agi en 1989 en tant que conseiller à l'OMS et à l'IPCS (International Programme for Chemical Safety) en matière de toxicologie *in vitro*.

Le laboratoire de toxicologie *in vitro* de la Division de la toxicologie des médicaments semble avoir établi un programme dynamique et productif dans un domaine actuellement de premier plan en Europe, et aux États-Unis plus récemment, mais qui semble encore largement négligé au Canada.

La réorganisation interne d'espace et de personnel effectuée en 1989 a donné lieu à une modification du laboratoire susmentionné, qui n'existe plus dans sa forme première au sein de la Division de la toxicologie des médicaments. Il a plutôt été réaffecté, avec un programme modifié, à la Section de biotechnologie de la Division de l'identification de drogues.

En 1989-1990, la Division d'identification de drogues a entrepris des études sur des modèles *in vitro* pouvant réduire l'utilisation d'animaux; ces changements s'inscrivent en partie dans le cadre de la réorganisation dont il a déjà été question.

Les études sur les systèmes microbiologiques (Foster, 1989a) ont permis d'étendre l'application pratique des modèles microbiens au moyen de la validation sans équivoque de la production de toute la gamme de métabolites connus ou suspectés qui sont produits par les mammifères à partir de plusieurs substances apparentées (Foster *et al.*, 1989b). La caractérisation des interactions médicamenteuses constitue une des utilisations de ces modèles microbiens comme pour l'identification des régimes thérapeutiques susceptibles d'induire des réactions indésirables.

Les études visant à identifier dans les tissus tumoraux les variants mutagéniques, qui peuvent servir de marqueurs génétiques utiles pour le diagnostic précoce et la caractérisation de certains cancers, sont en place.

Les méthodologies analytiques en chimie des protéines font actuellement l'objet de recherches à la Division de l'identification de drogues. Ces méthodes trouvent leur application particulièrement dans l'établissement des critères de détermination de la pureté, de la stabilité et de l'activité des nouveaux produits biotechnologiques.

Les activités de culture cellulaire ont été entreprises d'abord dans la section de la Division de la toxicologie des médicaments; celle-ci étudie le métabolisme *in vitro* des médicaments sur des cultures primaires d'hépatocytes de rat, qui constituent également des cellules cibles dans les études sur le mécanisme des médicaments hépatotoxiques. Une méthode *in vivo - in vitro* sur des coupes de rein de cochon d'Inde a aussi été introduite dans ce laboratoire dans le cadre d'une étude sur les effets néphrotoxiques de doses répétées de certains antibiotiques.

La Section de la toxicologie de la reproduction du Bureau de recherche sur les médicaments a utilisé un nombre restreint d'embryons de souris à des stages précoces (deux à quatre jours) à des fins de dépistage des effets tératologiques de médicaments (Buttar *et al.*, 1986). La mesure de la libération de prostaglandines, indiquant le niveau d'irritation vaginale, constitue une autre méthode utilisée.

11.1.3 La Direction de l'hygiène du milieu

La Section des substances mutagènes de la Direction de l'hygiène du milieu est l'unité la plus importante et la mieux établie au sein de la DGPS et la seule vouée expressément à la recherche en mutagénèse, à l'aide à la recherche de réglementation et à la recherche et au développement de méthodologies.

Les chercheurs scientifiques de ce groupe ont activement représenté auprès des organismes internationaux, tant au niveau national qu'international, les intérêts de Santé et Bien-être social Canada dans les symposiums sur la mutagénèse et l'environnement, en plus d'organiser divers symposiums sur la mutagénèse, la cancérogénèse et l'évaluation des risques (Douglas *et al.*, 1988) auxquels ils ont

participé. Comme l'indique le nom de la section, la plupart des activités de recherche et d'essai qu'elle a effectuées jusqu'à présent se sont concentrées dans la spécialité de la toxicologie génétique.

Selon les toxicologues généticiens de cette section, et de l'avis de nombreux scientifiques œuvrant dans ce domaine, les chances de développer des tests *in vitro* appropriés pouvant servir de remplacements complets aux tests de toxicité aiguë sont actuellement bien minces.

Cette opinion s'explique par le fait que les effets toxiques aigus des substances reflètent leurs interactions avec l'environnement pharmacocinétique et métabolique de l'animal entier, et qu'ils sont de plus influencés par voie d'exposition. Ces conditions ne peuvent être reproduites *in vitro*, où l'impact est directement placé sur la cellule en culture. Il est recommandé d'orienter les efforts vers le développement de protocoles *in vivo* qui utilisent aussi peu d'animaux que possible.

Les scientifiques de la Section des substances mutagènes ont joué un grand rôle dans l'élaboration du document de la DGPS de 1987 intitulé *Utilisation des tests de toxicité génétique dans les règlements et la recherche*, qui fixe les normes à suivre dans l'élaboration de lignes directrices et de règlements précis concernant les tests de la mutagénicité et qu'utilise la DGPS. Une édition modifiée de ce document, *Utilisation des tests de toxicité génétique dans les règlements*, est en cours de préparation et sera distribuée au public.

Le Bureau des dangers des produits chimiques de la Direction de l'hygiène du milieu a également appuyé, par le biais de contrats et autres stimulants financiers, plusieurs projets de recherche extra-muros d'autres établissements canadiens portant sur le développement ou la modification de méthodes substitutives.

11.1.4 La Direction des aliments

Au sein de la DGPS, la recherche et l'évaluation en toxicologie *in vitro* intéresse également la Direction des aliments. D'ailleurs, la Section de la génotoxicité et cancérogénèse de la Division de la recherche toxicologique y poursuit actuellement un programme actif sur l'application de la toxicologie *in vitro* (surtout la génotoxicologie) aux problèmes concernant la section de la réglementation de la Direction des aliments. En plus d'assurer les fonctions de ce service, les chercheurs de la section doivent entreprendre des projets de recherche ayant un impact direct sur les méthodes d'évaluation toxicologique *in vitro* ou y collaborer (Rogers *et al.*, 1988).

Un article tout récent portant sur l'évaluation de la reproductibilité de quatre tests à court terme de deux génotoxines connues, l'éthyl-méthyl sulfonate (EMS) à action directe et le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA) à action indirecte, concluait que les essais Échange entre chromatides sœurs et Résistance à la thioguanine (TGR Thioguanine Resistance) présentent une meilleure reproductibilité que les essais Micronucléus et Résistance à la ouabaïne (Boyes *et al.*, 1990).

Un nouveau projet vise l'adaptation de méthodes de cytométrie de flux pour améliorer la collecte de données provenant d'études *in vitro* et d'études *in vivo* mettant en jeu l'immunologie, la prolifération cellulaire et la ploïdie.

11.2 Les laboratoires d'hygiène vétérinaire

L'Unité d'évaluation des produits biologiques de la Division des laboratoires d'hygiène vétérinaire (DLHV) est responsable de la réglementation des produits biologiques vétérinaires. Cette unité a un programme précis exigeant que le nombre minimum nécessaire d'animaux soit utilisé dans les tests d'efficacité. Dans chaque cas, il faut tenir compte de la pertinence du test et de la disponibilité d'une méthode substitutive *in vitro* acceptable. Le développement des tests concerne également la recherche et le développement de tests directs (essai immuno-enzymatique, etc.).

En ce qui concerne le diagnostic de la rage, la DLHV a activement développé l'usage du «test d'infection rabique de culture cellulaire» en remplacement du test d'inoculation de la souris pour confirmer la présence du virus de la rage dans les présentations concernant les animaux en contact avec l'être humain. Cette procédure a permis effectivement de réduire l'utilisation de souris dans les tests de la rage de 30 000 environ par an au Canada. Le fait que la période de confirmation (rapport d'évaluation des risques) ait été réduite de 35 à quatre jours est également impressionnant.

11.3 Les centres toxicologiques universitaires

En 1988, au Canada, trois centres de toxicologie régionaux établis dans des universités formaient un réseau canadien de centres toxicologiques. Les établissements concernés sont le Centre interuniversitaire de recherche en toxicologie de l'Université de Montréal et de l'Université du Québec à Montréal, le Canadian Center for Toxicology de l'Université de Guelph, et le Toxicology Research Centre de l'Université de la Saskatchewan.

Ces centres sont actuellement engagés séparément dans de vastes programmes de recherche financés par divers organismes canadiens. Une partie de cette recherche se rapportera au développement de procédures de toxicologie *in vitro*.

Le groupe de recherche en toxicologie de l'Université de Montréal et de l'Université du Québec à Montréal (qui constitue le noyau oriental du réseau des centres de toxicologie) s'est attaché à la recherche sur l'utilisation et le développement de procédés *in vitro*. Le programme actuel du département de chimie de l'Université du Québec à Montréal utilise surtout des cultures d'hépatocytes comme modèle cellulaire de recherche sur le développement, l'amélioration et l'utilisation de divers systèmes *in vitro* (sondes de membrane, contrôle de l'homéostase calcique, établissement de conditions de cultures de cellules hépatiques à long terme optimales convenant aux études sur la transformation cellulaire et les marqueurs de tumeurs, comme l'oncomoduline.

Les tests de génotoxicité et de cytométrie de flux sont également soulignés dans leurs travaux qui bénéficient d'aide dans le cadre du programme industrie-université du CRSNG à titre de projet de recherche conjointe avec un important laboratoire d'analyses sous contrat canadien, BioRecherche Inc., de Beaconsfield (Québec).

Un objectif ultime est la conception de protocoles *in vitro* améliorés qui peuvent finir par influencer favorablement l'introduction et l'acceptation de meilleurs règlements sur la protection de la santé et de l'environnement.

Le Centre de recherche en toxicologie de l'Université de Saskatchewan constitue le noyau occidental du réseau canadien des centres de toxicologie. Dans le cadre de ses activités de recherche courante, ce centre enquête sur l'utilisation de bactéries photoluminescentes comme méthode permettant de déterminer la toxicité dans les milieux aqueux. Cette méthode est connue sous le nom d'essai biologique Microtox. On a mené des études quantitatives des relations entre la structure et l'activité, et il semble que la validation et l'accueil favorable ne soient pas éluignés. Ce centre de recherche en toxicologie a également réalisé des expériences avec des cultures Lemna pour étudier la prédiction de la toxicité chez les plantes.

11.4 Autres programmes universitaires

Outre les centres susmentionnés, plusieurs chercheurs universitaires bénéficiant de subventions de recherche sont engagés dans des projets orientés vers le développement ou l'évaluation de méthodologies toxicologiques *in vitro*.

En plus de ces projets financés à des fins précises, plusieurs départements universitaires sont depuis longtemps engagés dans l'avancement des techniques de culture cellulaire (département d'anatomie, Université de la Saskatchewan) et de simulation par ordinateur (Université McMaster) dans la mesure où celles-ci se rapportent aux essais toxicologiques. Les méthodes de culture cellulaire ont été au centre des travaux de S. Federoff, du département d'anatomie de l'Université de la Saskatchewan, qui donne des cours annuels en culture tissulaire très bien connus et fréquentés par de nombreux étudiants. Pour ces cours, M. Federoff a récemment reçu du Conseil de recherches médicales du Canada une subvention de 100 000 dollars en équipement et il reçoit chaque année une aide de fonctionnement du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA). Il y a environ quatre ans, M. Federoff s'est consacré aux cultures d'agrégats de tissus nerveux pour étudier les effets des pesticides. L'une des méthodes développées semble particulièrement prometteuse et elle a été publiée (Segel et Federoff, 1989a, b).

L'Université de la Colombie-Britannique présente un mini-cours annuel sur les fondements de la culture cellulaire (coordonné par D. Mather) ouvert aux étudiants des trois autres universités de la Colombie-Britannique. Ce cours est financé à parité par l'Université de la Colombie-Britannique et la SPCA de la province dans le cadre de la démarche coopérative de ces organisations, démarche orientée vers

le développement et l'avancement de méthodes substitutives à l'expérimentation animale dans la recherche, l'enseignement et les tests.

Cette communauté universitaire, dans son ensemble, est connue par l'intermédiaire de l'Association des universités et collèges du Canada, pour son appui au développement et à l'utilisation de méthodes d'essais substitutives (Appendice 5). Cet appui est encore renforcé par la participation active du CCPA en ces domaines. Le CCPA appuie les activités visant à réduire l'utilisation d'animaux dans la recherche et les essais et à améliorer les méthodes d'expérimentation animale, et il est doté d'un comité consultatif permanent sur les «méthodes substitutives» (Rowsell, 1987).

Les universités spécifiques ont tendance à adopter des positions officielles en ce qui concerne le recours aux animaux dans les essais de recherche et dans l'enseignement -- sans doute en réponse à des pressions publiques réelles ou ressenties. C'est particulièrement le cas des universités associées aux centres de toxicologie ou aux collèges médicaux ou vétérinaires. L'annexe 6 présente l'exemple du genre de recommandation proposée concernant les essais de Draize et la LD50.

11.5 Les subventions de recherche

La majorité de la recherche en toxicologie *in vitro* au Canada est financée par le biais des subventions stratégiques du CRSNG, puisqu'il s'agit du seul organisme d'aide du Canada à avoir une catégorie pour les méthodes et les techniques. Cette catégorie, sous la rubrique d'Écologie du milieu, permet de financer le développement de méthodes innovatrices. En 1987-1988, le CRSNG a cité au moins dix études de recherche qui semblaient être liées soit directement soit indirectement au développement et à la modification (amélioration) des procédés d'essai *in vitro*, du genre de ceux décrits dans le présent rapport. Le financement total de ces recherches dépassait 1,3 million de dollars (CRSNG, 1987-1988).

Parmi les autres organismes de financement nationaux, le Programme national de recherche et de développement en matière de santé (PNRDS) du ministère fédéral de la Santé et du Bien-être social appuie les projets de recherche en développement de méthodes *in vitro* lorsque ceux-ci sont clairement orientés vers la santé. Ces projets ne répondent pas à une catégorie précise du PNRDS et chacun est traité séparément.

Un des projets appuyés dans le cadre du PNRDS était justement le Bureau de recherche sur les médicaments dont il a été question précédemment. Un autre projet financé par le PNRDS en 1987 appuyait la collaboration de l'Université de Guelph à un projet lancé par le Bureau de recherche sur les médicaments. Cette recherche, sous l'initiative de la Division de la toxicologie des médicaments, concernait un sondage des méthodes d'essais de toxicologie génétique utilisant des cellules en culture de mammifères. Cette étude a analysé les nombreuses et diverses modifications de protocole concernant quatre tests couramment utilisés dans différents laboratoires d'analyses de la génotoxicité. Elle a donné lieu à la publication en cours de modèles de protocoles recommandés pour chacun des tests

sondés ainsi que pour l'entretien des lignées cellulaires concernées (p. ex. : Swierenga *et al.*, 1990a). Les tests examinés étaient le test de mutation chez le hamster chinois et les lignées cellulaires de lymphome murin; les essais de transformation de cellules; les essais d'aberration chromosomique et d'échange entre chromatides sœurs.

D'autres programmes nationaux d'octroi de subventions, comme les subventions de fonctionnement du CRM et du CRSNG, tiendront compte de demandes de développement et d'évaluation de méthodologies, même si elles ne peuvent être classées en fonction des catégories (disciplines) normalement utilisées par le comité d'examen. C'est pourquoi les chances que ce type de demandes, en concurrence avec des projet de recherche fondamentale, obtienne une aide financière sont, dans la plupart des cas, minces.

Il semble très difficile de trouver au Canada le financement nécessaire à la recherche pour la mise au point méthodologique (à moins qu'il n'y ait des applications commerciales évidentes et qu'il n'y ait possibilité d'en tirer profit -- le cas échéant, il est possible de faire une demande pour un octroi CNRS-PARI). Peut-être pour ces raisons, de tels projets doivent chercher de l'aide aux États-Unis (ce qui peut constituer la première étape du processus de la «fuite des cerveaux»). Le fait que deux des dix projets subventionnés par le CAAT de Johns Hopkins à l'automne 1988 étaient des applications canadiennes d'études très poussées et innovatrices directement liées à la mise au point méthodologique illustre bien cette situation. Il est également intéressant de remarquer qu'il s'agissait des deux seules demandes provenant d'universités canadiennes parmi les 50 projets soumis pour l'examen par les pairs, et que les deux ont été subventionnées.

11.6 Un modèle de collaboration

Le comité mixte sur les méthodes substitutives à l'expérimentation animale dans la recherche (Joint Committee on Alternatives to Live Animals in Research) de l'Université de la Colombie-Britannique (UBC) et de la SPCA de la Colombie-Britannique a fourni des fonds à cinq chercheurs de l'UBC en 1987. Les projets consistaient en un cours de deux jours sur la culture cellulaire animale (auquel ont assisté 26 étudiants des trois universités de Colombie-Britannique), en une étude de modélisation par ordinateur de l'arythmogénèse ischémique, et enfin, en une étude portant sur les interactions des médicaments avec les groupes enzymatiques métabolisants du foie. D'autres projets financés touchent la caractérisation d'une sonde d'ADN pour diagnostiquer les souches toxiques de la bactérie de la diphtérie ainsi qu'une étude de nématodes vivant à l'air libre afin d'en déterminer l'utilité comme organisme d'essai substitutif au test de létalité systématique sur la souris pour déterminer les toxines paralysantes des crustacés et de certains contaminants alimentaires connus.

Ce projet mixte UBC-SPCA de la Colombie-Britannique a démarré en 1983 à la suite d'une initiative constructive de la SPCA de la province qui avait contacté le vice-président de la recherche de l'UBC (P. Larkin) de l'époque et parlé de la possibilité d'établir un programme de fonds paritaires. Une contribution annuelle d'au moins 10 000 dollars de chaque organisation a été allouée à des projets de

recherche universitaire sélectionnés sur les «méthodes substitutives» et, plus récemment, au bref cours annuel sur la culture tissulaire. En 1989, la SPCA de la Colombie-Britannique et l'UBC ont consenti à donner chacune 25 000 dollars et à s'efforcer d'obtenir une subvention paritaire de 50 000 dollars auprès du CRSNG pour l'établissement, à l'UBC, d'une chaire pour la protection des animaux attachée à la recherche pertinente sur les méthodes substitutives à l'expérimentation animale. Aux fins de ce projet unique et louable, le financement de l'industrie sera également sollicité.

11.7 L'harmonisation des règlements et des lignes directrices

À l'heure actuelle, il existe de bonnes raisons de réviser les règlements et les lignes directrices relatifs aux tests toxicologiques, raisons qui ne sont pas simplement liées à l'évolution du climat social et technologique. La plus importante est la tendance du commerce mondial à se déplacer pour s'orienter vers les blocs de marchés communs et de libre-échange.

S'adapter aux exigences des marchés nécessitera une meilleure harmonisation et rationalisation des règlements d'importation et de distribution des différents partenaires commerciaux, lorsque ces règlements semblent protectionnistes. La réalité de ce problème a été clairement démontrée récemment en 1989 par la soudaine poussée de controverses qui s'est fait jour aux États-Unis et au Canada au sujet de l'utilisation du pesticide alar sur les pommes.

Les progrès rapides de la biotechnologie et du génie biologique garantissent la présence continue de ces problèmes, qui ne pourront sûrement être résolus (ou de préférence évités) que par l'harmonisation des règlements et l'acceptation de lignes directrices communes, pour évaluer les risques et faire les tests. Dans ce processus, il sera nécessaire de se mettre d'accord sur le rôle et la place à donner à de nombreux tests toxicologiques traditionnels modifiés et *in vitro* et des systèmes d'évaluation des risques (Ennever *et al.*, 1987; Clayson, 1987).

L'Europe a connu une activité accélérée et considérable en ce sens, la CEE et l'OCDE jouant les principaux rôles à l'aube de 1992, date d'ouverture du marché commun. Le Canada a joué un rôle important dans les délibérations du Groupe des produits chimiques de l'OCDE et il est logique d'espérer que cette organisation fournira un forum utile pour l'harmonisation de nos lignes directrices avec celles des États-Unis et celles de nos autres partenaires commerciaux en matière de toxicologie.

Il semble heureux, et c'est probablement fortuit, que de nombreux organismes de réglementation du Canada et de différents pays procèdent actuellement à la révision de leurs règlements concernant les tests d'innocuité, ainsi que des lignes directrices relatives à la toxicologie des produits chimiques, d'autres polluants de l'environnement, de pesticides et de produits pharmaceutiques.

Il reste à espérer que ces révisions feront plus qu'évoquer le rôle possible que peuvent jouer les tests des effets mutagènes en tant que tests de dépistage. Les réalités de la contamination du milieu et des risques possibles pour la santé,

implicites en l'absence de profils toxicologiques appropriés d'un nombre élevé et toujours plus grand de «nouveaux» produits toxicologiques, rendent nécessaire de songer sérieusement à une plus grande utilisation des nouvelles méthodologies *in vitro* et de faire une révision véritable des exigences concernant la réglementation.

BIBLIOGRAPHIE

Abernathy, D.J., and Boreiko, C.J., Promotion of C3H/IOT 1/2: Morphological Transformation by Polychlorinated dibenzo-p-dioxin isomers, *Carcinogenesis 8*, 1987, pp. 1485-1490.

Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella-Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Muta. Res. 31*, 1975, pp. 347-364.

Ames, B.N., Magaw, M. and Gold, L.S., Ranking Possible Carcinogene Hazards, *Science 236*, 1987, p. 271-280.

Anon., News and Reports, *Vet. Rec. 121*, (ii), Sept. 12, 1987, pp. 241-242.

Anon., The FDA and Trends in Animal Testing, *US Regulatory Reporter 4*, 1988, pp. 3-7.

Balls, M., The OTA Report: A Critical Appraisal, *ATLA 14*, 1987, pp. 289-306.

Bass, R., Reproduction Toxicity, in *Proceedings OECD Seminar Chemicals Testing and Animal Welfare*, National Chemicals' Inspectorate, Stockholm, 1986, pp. 201-219.

Bass, R., Alternatives to Animal Experimentation: What Have the Regulatory Authorities in Europe Done? *Swiss Pharma. 10*, (10a), 1988, pp. 28-29.

Blakey, D.H., Duncan, H.M.V., Wargovich, M.J., Goldberg, M.T., Bruce, W.R., and Heddle, J.A., Detection of Nuclear Anomalies in the Colonic Epithelium of the Mouse, *Cancer Res. 45*, 1985, pp. 242-249.

Boyes, B.G., Rogers, C.G., Karpinski, K., and Stapley, R., A Statistical Evaluation of the Reproducibility of Micronucleus, Sister-Chromated Exchange, Thioguanine-Resistance and Oubaine Resistance Assays in V79 Cells Exposed to Ethyl Methane Sulfonate and 7,12-Dimethylbenz(A)Antharacene, *Mutation Research*, 1990, en cours d'impression.

Brinkhorst, L.J., discours de bienvenue du Symposium, Animal Experimentation and Validated Alternatives: Problems and Perspectives, de la C.C.E., EFPIA de Bruxelles, mai 1988, *Swiss Pharma. 10* (10a), 1988, pp. 8-9.

Brockman, H.E. and DeMartini, D.M., Utility of Short-Term Tests for Genetic Toxicity in the Aftermath of the NTP's Analysis of 73 Chemicals, *Environ. Molec. Mutagen. 11*, 1988, pp. 421-435.

Bruce, R.D., A Confirmatory Study of the Up-and-Down Method for Acute Oral Toxicity Testing, *Fundam. Appl. Toxicol. 8*, 1987, pp. 97-100.

Buttar, H.S., Bura, C., and Moffatt, J.H., The *in vitro* Effects of Benzalkorium Chloride on Preimplanation Mouse Embryos, *Teratology 33, 1986, 64 C.*

Butterworth, B.E., Non-Genotoxic Carcinogens, *CIIT Activities, 7*, 1987, pp. 1-6.

Cano, J.P., Alternatives to Animal Experimentation: What has Industry done? *Swiss.Pharma. 10* (10a), 1988, pp. 25-26.

Cembella, A., and Tood, E., Algae in Sea Food and Drinking Water in Palle Krogh, Ed., *Control Measures in Shell Fish and Fin Fish Industries*, chapitre 12, Academic Press, Londres (Royaume-Uni), 1990, en cours d'impression.

Clayson, D.B., The Need for Biological Risk Assessment in Reaching Decisions about Carcinogens, *Muta. Res. 185*, 1987, pp. 243-269.

Cohen, C., The Case for the Use of Animals in Biomedical Research, *New Eng. Jour. Med. 315*, 1986, pp. 865-870.

Contreras, G., Biologicals for Human Use, in *Proceedings of Symposium on Reducing Animal Use in Toxicity Testing in Canada and Internationally*, Fédération des sociétés canadiennes de protection des animaux, 1987, pp. 33-37.

CRSNG, Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, *Strategic Grants in Environmental Toxicology*, 1987-1988, 1988, p. 65.

Dean, J.H., Thurmond, L.M. and Rosenbaum, D.J., Immunotoxicology: Reduced Animal Usage Through the Use of *in vitro* Lymphoid Cell Models, in *Proceedings of an OECD Seminar on Chemicals Testing and Animal Welfare*, National Chemical Inspectorate, Stockholm, 1986a, pp. 232-248.

Dean, J.H., Lauer, L.D., House, R.V. and Thurmond, L.M., Immunomodulation: Assessing the Immuno-enhancing and Immunosuppressive Properties of Xenobiotics, *in Toxicology of the Nineties a CIBA-GEIGY International Toxicology Workshop 1985*, Mary Ann Liebert Inc. Publ., 1986b, pp. 47-58.

Douglas, G.R., Blakey, D.H. and Clayson, D.B., Genotoxicity Tests as Predictors of Carcinogenesis: An Analysis., *Mutation Research 196*, 1988, pp. 83-93.

Draize, J.H., Woodward, G., and Calvery, H.O., Method for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes, *J. Pharm. Exper. 82*, 1944, pp. 377-389.

ECETOC, European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, The EEC Sixth Amendment: A Guide to Risk Evaluation for Effects on Human Health, *Rapport technique ECETOC n° 14*, 1984, Bruxelles, p. 40.

ECETOC, European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, Acute Toxicity Tests LD50 (LC50) Determinations and Alternatives, *Monographie ECETOC n° 6*, Bruxelles, 1985, p. 38.

ECETOC, European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, Structure Activity Relationships in Toxicology and Ecotoxicology: An Assessment, *Monographie ECETOC n° 8*, 1986, p. 88.

ECETOC, European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, Eye Irritation Testing, *Monographie ECETOC n° 11*, 1988, p. 65.

Ennever, F.K., Noonan, T.J. and Rosenkranz, H.S., The Predictability of Animal Bioassays and Short-Term Genotoxicity Tests for Carcinogenicity and Non-Carcinogenicity in Humans, *Mutagenesis 2*; 1987, pp. 73-78.

Enselin, K., An Overview of Structure-activity Relationship as an Alternative to Testing in Animals for Carcinogenicity, Mutagenicity, Dermal and Eye Irritation and Acute Oral Toxicity, *Toxicol. Indust. Health 4*, 1988, pp. 479-498.

Foster, B.C., Coutts, R.T., and Pasutto, F.M., Biotransformation of Arylalkylamines by Cunninghamella echinulata, *Xenobiotica 19*, 1989a, pp. 531-538.

Foster, B.C., Wilson, D.L., and McGilveray, I.J., Effect of Sparteine and Quinidine on the Metabolism of Methoxyphenamine by Cunninghamella echinulata, *Xenobiotica 19*, 1989b, pp. 445-452.

FDR Bundesanzeiger, n°96, 27 mai 1989, p. 2583.

FRAME News, «Cruelty Free» Labelling a «Cruel Deception?», n° 22, p. 1.

FRAME News, «Cosmetic Testing: A Summer of Intense Activity», n° 23, pp. 10-11.

Francis, E.Z. and Farland, W.H., Application of the Preliminary Developmental Toxicity Screen for Chemical Hazard Identification Under the Toxic Substances Control Act, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 7*, 1987, pp. 107-117.

Frazier, J.M., Gad, S.C., Goldberg, A.M., McCully, J.P., and Meyer, D.R., A Critical Evaluation of Acute Occular Irritation Testing, in *Alternative Methods in Toxicology*, vol. 4, New York, Mary Ann Liebert Inc., 1987.

Gad,S.C., and Well, C.S., Statistics for Toxicologists, in A.W. Hays, ed., *Methods in Toxicology*, New York, Raven Press, 1982, pp. 273-309.

Goldberg, A.M., Alternatives in Toxicology, Problems and Opportunities, in *Proceedings of OECD Seminar on Chemicals, Testing and Animal Welfare*, National Chemicals Inspectorate, Stockholm, 1986, pp. 249-260.

Home Office U.K., *Report on the LD50*, Home Office London, 1979, p. 31.

IARC, International Agency for Research on Cancer, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*: Overall Evaluation of Carcinogenicity, An Update of IARC Monographs 1-42, Supp. 7, 1987, IARC, Lyon.

IRCC, Investor Responsibility Research Center, Social Issues Service: Animal Testing and Alternatives for Consumer Product Safety, *IRCC Analysis J.*, Washington, D.C., 1989, p. 19.

Kennedy, Jr., G.L., Ferenz, R.L., and Burgess, B.A., Estimation of Acute Oral Toxicity in Rats by Determination of the Approximate Lethal Dose Rather than the LD50, *J. Appl. Toxicol. 6*, 1986, pp. 145-148.

Lave, L.B., Using Economic Data and Short-Term Tests, in *Proccedings of OECD Seminar on Chemical Testing and Animal Welfare*, National Chemicals Inspectorate, Stockholm, 1986, pp. 99-109.

Lave, L.B., Ennever, F.K., Rosenkranz, H.S. and Olmenn, G.S., Information value of the rodent bioassay, *Nature 336*, 1988, pp. 631-633.

Lohman, P.H.M., Vijg, J., Uitterlinden, A.G., Slagboom, P., Gossen, J.A., and Berends, F., DNA Methods for Detecting and Analyzing Mutations in vivo, *Muta. Res. 181*, 1987, pp. 227-234.

Lonngren, R., remarques de clôture du président *in Proceedings*: *OECD Seminal on Chemical Testing and Animal Welfare*, National Chemicals Inspectorate, Stockholm, 1986, pp. 320-326.

McCormick, H., Animals and Alternatives: Economic and Political Considerations, *ATLA 14*, 1987, pp. 353-360.

Maier, P., The Granuloma Pouch Assay in F.J. De Serres, ed., *Chemical Mutagens, vol. 9*, New York, Plenum Publ. Corp., 1984, pp. 233-260.

Matula, T.I., Wood, R.J., and Hughes, D.W., Application of a Bacterial Cell Reactivity Assay to the Evaluttion of Drug Safety, *Drug Safety 1*, 1990, en cours d'impression.

Morrissey, R.E., Lamb IV, J.C., Schwetz, B.A., Teague, J.L. and Morris, R.W., Association of Sperm, Vaginal Cytology and Reproductive-organ Weight Data with Results of Continuous Breeding Reproductive Studies in Swiss (CD-1) *Mice, Fund. and Appl. Toxicol. II*, 1988, pp. 359-371.

NAS-NRC, National Academy of Sciences, National Research Council, *Toxicity Testing: Strategies to Determine Needs and Priorities*, Washington, D.C., National Academy Press, 1984, p. 382.

NRC, National Research Council, *The Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research*, Washington, D.C., National Academy Press, 1988, p. 102.

OTA, U.S. Congress, Office of Technology Assessment, *Alternatives to Animal Use in Research, Testing and Education*, (Washington, D.C., U.S. Government Printing Office, OTA-BA-273, Feb. 1986), 1986, p. 441.

Prival, M.J. and Dunkel, V.C., Reevaluation of the Mutagenicity and Carcinogenicity of Chemicals Previously Identified as "False Positives" in the Salmonella typhimurium Mutagenicity Assay, *Environ. Mutagen. 1*, 1989, pp. 1-24.

Ramel, C., Genotoxicity, in *Proceedings OECD Seminar on Chemical Testing and Animal Welfare*, National Chemicals Inspectorate, Stockholm, 1986, pp. 194-200.

Roberfroid, M., Introduction to the Presentation of the 1988 Award during the Symposium: Animal Experimentation and Validated Alternatives: Problems and Perspectives, *Swiss Pharma. 10 (10a)*, 1988, pp. 10-12.

Rogers, C.G., Boyes, B.G., Matula, T.I., Heroux-Metcalf, C., and Clayson, D.B., A Case Report: A Multiple End-Point Approach to Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of Erythrosine (FD and C Red No. 3) in a V79 Hepatocyte-mediated Mutation Assay, *Muta. Res. 205*, 1988, pp. 415-423.

Rowsell, H.C., Animals or Replacements: The Canadian Council on Animal Care (CCAC) Perspective, in C.E. Connolley-Mendoza ed., *Proceedings of CCAC Workshop on Alternatives to Animals in Research*, September 1987, Suffield Special Publication n° 122, Suffield (Alberta).

Schelde, E., Maurer, T., Potokar, M., Schmidt, W.M., Schulz, K.M., Roll, R., and Kayser, D., A Differentiated Approach to Testing Skin Sensitization. Proposal for a New Test Guideline Skin Sensitization. *Arch. Toxicol. 63*, 1989, pp. 81-84.

Schop, R.N., and Goldberg, A.M., Nongenotoxicity of Minoxidil in mouse hair follicles as determined by the Nuclear Aberration Assay, *Toxicol, Appli. Pharm. 92*, 1988, pp. 150-154.

Segal, L.M. and Federoff, S., Cholinesterase Inhibition in Agregate Cultures of Neural Cells from the Fetal Rat Brain by Organophosphorous and Carbamate Pesticides: The Effect of Metabolic Activation and Pesticide Mixtures, *Toxicol. in Vitro 3 (2)*, 1989a, en cours d'impression.

Segal, L.M. and Federoff, S., The Acute and Sub-Chronic Effects of Organophosphorous and Carbamates Pesticides on Cholinesterase Activity in agregate Cultures of Neural Cells from the Rat Brain, *Toxicol. in Vitro 3 (2)*, 1989b, en cours d'impression.

Selye, H., Use of Granuloma Pouch Technique in the Study of Antiphlogistic Corticoids, *Proc. Soc, Expl. Biol. Med. 82*, 1952, pp. 328-333.

Shelby, M.D., and Stasiewicz, S., Chemicals Showing no Evidence of Carcinogenicity in Long-term, Two-species Rodent Studies: The Need for Short-term Test Data, *Environ. Mutagen. 6*, 1984, pp. 871-878.

Silano, V., Stammati, A., and Vittozzi, L., Possibilities for *in vitro* Methods, in *Proceedings of an OECD Seminar on Chemical Testing and Animal Welfare*, National Chemicals Inspectorate, Stockholm, 1986, pp. 152-182.

Sivak, J.G., Gershon, D., Dovrat, A. and Weerheim, J., Ocular Lens Organ Culture System for *in vitro* Toxicology, in A.M. Goldberg ed., *Alternative Methods in Toxicology Series*, vol. 5, 1987, pp. 499-506.

Swierenga, S.H.H. Use of Low Calcium Medium In Carcinogenicity Testing: Studies with Rat Liver Cells, *in In Vitro Models for Cancer Research, Vol. II*, M.M. Webber, ed., CRC Press, 1985, pp. 61-89.

Swierenga, S.H.H., Brillinger, R.L., Gilman, J.P.W. and Nestmann, E.R. Standard Protocols based on Survey of Current Practices in Genotoxicity Testing Laboratories I. Unscheduled DNA Synthesis in Rat Hepatocyte Cultures, *Mutat. Res.*, 1990, en cours d'impression.

Swierenga, S.H.H., Lee. J.F., and Hasnain, S.H., Cytotoxicity and Genotoxicity of Benzoyl Peroxide, *Toxicology In Vitro*, 1990b, en cours d'impression.

Swierenga, S.H.H., Marceau, N., Katsuma, Y., French, S.W., Mueller, R., and Lee, F., Altered Cytokeratin Expression and Differentiation Induction During Neoplastic Transformation of Cultured Rat Liver Cells by Nickel Subsulfide, *Cell Biol. Toxicol. 5*, 1990c, pp. 271-286.

Swierenga, S.H.H., Yamasaki, H., Piccoli, C., Robertson, L., Bourgon, L., Marceau, N., Fitzgerald, D.J., Effects of Intercellular Communication in Human Keratinocytes and Liver-Derived Cells of Poly-chlorinate Biphenyl Congeners with Differing In Vitro Promotion Activities, *Carginogenesis*, 1990d, en cours d'impression.

Tennant, R.W., Margolin, B.H., Shelby, M.D., Zeiger, E., Haseman, J.K., Spalding, J., Caspary, W., Resnick, M., Stasiewicz, S., Anderson, B. and Minor, Prediction of Chemical Carcinogenicity in Rodents from *In Vitro* Genetic Toxicity Assays, *Science 236*, 1987, pp. 933-941.

Thakur, A.K., and Fezio, W.L., A Computer Program Estimating LD50 and Its Confidence Limits Using Modified Behrens-Reed-Muench Cumulant Method, *Drug Chem. Toxicol. 4*, 1981, pp. 297-305.

Trethewey, J., Baxter, D., Fisher, B.V., Sabey, G.A. and Webb, F.W., The Reduction in the Number of Animals Used in the Biological Assay of Insulin, *Develop. Biol. Standard, 64*, 1986, pp. 221-226.

Trevan, J.W., The Error of Determination of Toxicity, *Proc. Royal Society, London, 101-B*, 1927, p. 483.

University of California, *Report of the Animal Alternatives Task Force*, University of California, Berkeley (Californie), 1988, p. 54.

Upton, A.C. Availability of Toxicology Data on Existing Chemicals, in *Proceedings OECD Seminar on Chemical Testing and Animal Welfare*, National Chemicals Inspectorate, Stockholm, 1986, pp. 21-43.

Ungar, K., Atkinson, K. and Steer, S. (1990) INVITTOX Protocols, ATLA, 17, 407-410

Vijay, H.M., Burton, M., Young, N.M., Corlette, M., and Bernstein, I.L., Comparative Studies of Allergens from Mycelia and Culture Media of Four New Strains of Alternaria Tenius, *GRAMA 28*, 1989, pp. 53-61.

Waters, M.D., Stack, H.F., Rabinowitz and Garrett, N.E., Genetic Activity Profiles and Pattern Recognition in Test Battery Selection, *Mutat. Res. 205*, 1988, pp. 119-138, Stockholm, October 1988.

Zack, J.A. and Suskind, R.R., The Mortality Experience of Workers Exposed to Tetrachlorodibenzobioxin in a Trichlorophenol Process Accident, *J. Occup. Med.* 22, 1980, pp. 11-14.

Zbinden, G., The Prospects for Alternative Methods in Biomedical Research, Development and Production, *Swiss Pharma. 10 (10a)*, 1988, pp. 16-17.

Zbinden, G., Acute Toxicity, *in Proceedings OECD Seminar on Chemical Testing and Animal Welfare*, National Chemicals Inspectorate, Stockholm, 1986, pp. 183-193.

Zbinden, G. and Flury-Roversi, M., Significance of the LD50 Test for the Toxicological Evaluation of Chemical Substances, *Arch. Toxicol. 47*, 1981, pp. 79-99.

ANNEXE 1
PROCÉDURE À DOSE FIXE (PDF)

ÉTUDE DE COLLABORATION INTERNATIONALE TESTS DE TOXICITÉ ORALE AIGUË DE SUBSTANCES ET PRÉPARATIONS[1]

Introduction

1. Les méthodes d'évaluation de la toxicité orale aiguë généralement reconnues sont fondées sur des protocoles de doses jaugées auxquels des groupes d'animaux de laboratoire sont exposés, selon une gamme de niveaux de doses, la dose supérieure étant choisie pour son taux de létalité élevé. Ces procédures ont été codifiées dans la ligne directrice reconnue au niveau international (n° 401) et publiée par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) en 1981. Cette ligne directrice recommande d'exposer des rats à trois niveaux de dose au moins (cinq mâles et cinq femelles à chaque niveau), ces niveaux de doses étant choisis pour englober la DL50 «prévue». Cette DL50 prévue devait être calculée par analogie avec des composés semblables ou à partir d'une étude pilote ou étude au jugé, et lorsqu'aucune mort liée à un composé n'était prévue se produire au niveau de dose de 5 000 mg/kg de poids corporel, l'étude pouvait être réduite à un examen des effets toxiques à ce niveau de dose unique (test du seuil différentiel). La ligne directrice 401 a été révisée en 1987; les principales modifications se rapportent à une diminution du nombre d'animaux utilisés (de 30 à 20) et la réduction à 2 000 mg/kg de poids corporel de la dose du test de seuil différentiel.

2. Bien mené, ce genre de recherche de la toxicité aiguë -- souvent appelé DL50 -- peut fournir des données non seulement sur les doses potentiellement létales des substances utilisées mais, ce qui est plus important, sur les réactions aux doses de ces substances, entre autres la nature, le moment d'apparition et le résultat des signes de toxicité. Cette dernière information est essentielle pour procéder à une évaluation efficace des risques posés à l'environnement et à la santé humaine. Dans de nombreuses études, il est aussi possible de calculer mathématiquement la valeur de la DL50. Ces estimations, en dépit de leurs limitations reconnues,

---

[1] Cette étude est maintenant terminée (*ALTA 17*, pp. 63-64) et les membres du comité de mise à jour de l'OCDE examinent une proposition concernant une nouvelles ligne directrice de l'OCDE, intitulée «Toxicité orale aiguë, Méthode à dose fixe». La proposition originale du protocole, les instructions et l'exposé raisonné de l'étude sont repris ci-après en vue d'attirer l'attention sur la complexité de telles entreprises. La coopération et l'initiative internationale sont indispensables pour que l'étude de validation soit généralement accepté et qu'elle ait l'incidence désirée sur les règlements nationaux.

sont jugées importantes par les organismes de réglementation, tant pour la classification que pour l'étiquetage.

3. Depuis quelques années, les chercheurs en toxicologie mettent en doute la logique sur laquelle repose la méthodologie utilisée pour obtenir les valeurs de la DL50, tant pour des raisons scientifiques que morales en ce qui a trait au caractère humanitaire de ces procédures. Parallèlement, les toxicologues reconnaissent que dans un avenir prévisible, il sera toujours nécessaire d'étudier *in vivo* la toxicité aiguë des substances, non seulement pour protéger l'être humain et d'autres animaux contre l'intoxication aiguë, mais aussi pour obtenir des données sur la nature probable des signes importants de toxicité, sur le moment possible de leur apparition, ainsi que sur le taux et l'importance probables du rétablissement avec des doses sub-létales, données utiles à l'évaluation des risques. Une méthode de remplacement plus acceptable sur les plans scientifique et éthique, qui continuerait de fournir les renseignements nécessaires aux évaluateurs des risques et autres responsables, est donc requise de manière pressante.

4. En 1984, un nouveau protocole des tests de toxicité aiguë, fondé sur un protocole à dose fixe, a été préconisé par la British Toxicology Society (BTS). Il permettait d'éviter d'utiliser comme seuil la mort des animaux et se fiait plutôt à l'observation de signes évidents de toxicité développés au niveau d'une série de doses fixes. Ces niveaux de dose permettant d'observer des signes de toxicité pouvaient, disait-on, servir à classer les substances utilisées dans les tests, et étant donné que la mort ne déterminait pas la classification, tout animal souffrant inutilement pouvait être sacrifié sans que cela affecte les résultats de l'étude. Les doses sub-létales inférieures prescrites par cette méthode auraient tendance à réduire la gravité des signes de toxicité. Ces deux derniers points rendraient l'étude plus acceptable autant sur le plan moral que sur celui de la protection des animaux. Il semblait que cette étude, correctement menée, pourrait également permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés, probablement à un nombre aussi peu élevé que dix rats. Bien qu'une courbe de réaction aux doses n'ait pas été produite, les composés ayant des valeurs de la DL50 élevées, mais qui produisaient néanmoins de graves effets toxiques à des doses faibles (c'est-à-dire, composés présentant des courbes de réaction aux doses peu incurvées) pourraient, dans certains cas, être classés comme substances présentant une toxicité aiguë plus grande que celle qu'aurait permis de déterminer la seule valeur de la DL50. Enfin, certaines indications portaient à croire que la classification varierait moins d'un laboratoire à l'autre avec cette méthode qu'avec les méthodes courantes utilisant des DL50 notoirement connues pour leur manque de fiabilité.

5. La procédure à dose fixe a été soumise à une étude de validation au Royaume-Uni. et les résultats ont été publiés (*Human Toxicology* 6, 1987, p. 279). Ce fait indique la possibilité qu'un remplacement de l'étude traditionnelle de la toxicité aiguë, à la fois plus acceptable au niveau scientifique et moral, puisse aujourd'hui exister. En dépit des résultats de l'étude effectuée au Royaume-Uni, il ne serait pas réaliste d'espérer que le

protocole à dose fixe puisse être immédiatement adopté par les laboratoires, vu la nature internationale de l'industrie et les différentes exigences nationales des divers organismes de réglementation. Une autre étude de validation est actuellement en cours, cette fois-ci au niveau international. Cette étude examinera de nouveau les mêmes points que l'exercice du R.-U.; mais elle se penchera en plus sur la variation entre laboratoires.

6. Cette étude de validation sera entreprise sous le patronage de l'OCDE, avec le Royaume-Uni à sa tête, et pour encourager la participation d'autant de pays que possible, la Commission des communautés européennes (CCE) a consenti à la parrainer.[1]

Les évaluateurs de l'étude

7. Un petit groupe d'évaluateurs venant de l'industrie et du gouvernement du R.-U., sous la direction d'un coordinateur principal d'étude, a été établi pour contrôler les progrès de l'étude, coordonner les activités de tous ceux concernés, évaluer et interpréter les résultats de cet exercice, et préparer un rapport final. Les résultats feront l'objet de discussions lors d'une réunion organisée par la CEE à Munich du 19 au 21 septembre 1989.

8. Il est prévu que toutes les études seront effectuées conformément aux principes des bonnes pratiques des laboratoires de l'OCDE, bien que l'observation des phases critiques et la vérification des rapports finals par la qualité-assurance ne soient pas essentielles et seront à la discrétion du laboratoire.

La participation des laboratoires

9. Les principaux laboratoires de toxicologie d'environ 12 pays participent à cette étude. Il est probable que les laboratoires ne bénéficieront que d'un appui financier symbolique en ce qui concerne les travaux expérimentaux concernés. Les contributions des laboratoires pourront être reconnues (sauf s'ils ne le désirent pas) dans les rapports de cet exercice, mais les résultats des laboratoires individuels ne seront pas relevés par les évaluateurs.

---

[1] Il convient de noter que le test à dose fixe est proposé en tant que test de rechange, et non en tant que test de remplacement. Apparemment, il aura recours en moyenne à seulement trois animaux de moins par test chimique que le nombre préconisé par la ligne directrice de l'OCDE, révisée en 1987, et portant sur la DL50. Même si la mort n'est plus l'aboutissement nécessaire et que le test à dose fixe est donc plus acceptable sur le plan moral, il semble encore que d'autres changements doivent être apportés.

La sélection des substances utilisées dans les tests

10. Un maximum de 20 substances courantes sur le marché seront choisies aux fins de l'étude. Ces «substances de tests», soit des produits chimiques industriels et des pesticides, peuvent être autant des substances techniques (pures) que des préparations. Elles seront choisies en fonction de DL50 existantes administrées par voie orale aux rats, de manière à représenter toute la gamme, allant de très toxique à relativement inoffensif; elles couvriront autant les matières insolubles que les matières solubles dans l'eau et l'huile, et incluront toute une gamme de structures chimiques.

11. Ces matières seront stables dans les conditions de température ambiante et d'humidité normales. Elles seront numérotées par le fournisseur selon des codes, afin de garantir que les études sont conduites à l'aveuglette. Le fournisseur remplira une fiche signalétique pour chaque substance de test, fournissant des renseignements généraux essentiels sur la substance, indiquant le véhicule de dose à utiliser et donnant des conseils sur la préparation du matériel de dosage. Une étude de toxicité orale aiguë traditionnelle (ligne directrice de l'OCDE n 401) sera effectuée par la société Huntingdon Research (Royaume-Uni) pour chaque substance de test afin d'établir un point de référence «traditionnel» à l'évaluation des résultats de l'étude. Il est souhaitable que chaque laboratoire étudie chaque substance de test. Les laboratoires participants recevront une quantité suffisante de chaque substance à utiliser.

Le protocole des tests

13. Les substances utilisées dans les tests doivent être étudiées conformément au protocole présente à l'annexe 1. Pour être sûr que ce protocole est bien compris de ceux qui effectueront les études, les directeurs des études des laboratoires participant à cet exercice sont invités à communiquer avec le principal coordinateur de l'étude du R.-U., concernant tout problème qu'ils pourraient avoir avant de commencer les études ou pendant leur déroulement. Ils doivent adresser leurs questions par lettre, télex ou téléphone à :

M.J. Van den Heuvel (ou Dr R. Fielder)
Department of Health
Room 911
Hannibal House
Elephant & Castle
London SE1 6TE
Télex : 883669
Téléphone : 01-701-6380 Ext. 4584, 3080 ou 3891

et c'est à ce bureau même qu'il faut envoyer les rapports finals sur les tests.

Le calendrier

14. Il est très important que les laboratoires qui participent à l'étude s'efforcent d'entreprendre les tests dès que possible, après réception des composés de tests en novembre, et qu'ils remettent tous leurs rapports sur les tests à la personne-ressource en mars-avril 1989, au plus tard.

Rapport des résultats

15. Il est demandé aux laboratoires de préparer un rapport (en anglais) sur chaque substance testée; pour simplifier et harmoniser cette procédure, un formulaire de rapport de tests est annexé (Annexe 2). Veuillez noter que lorsqu'une même substance est testée plusieurs fois, il faut remplir un rapport différent pour chaque test.

16. L'évaluation des rapports par les évaluateurs comprendra :

    i) Une comparaison des données sur les signes de toxicité, etc., obtenues par une étude à dose fixe avec celles obtenues par une étude de toxicité orale aiguë traditionnelle avec la même substance.

    ii) L'utilité des résultats des études à dose fixe pour le classement des substances de tests, en particulier en ce qui concerne les divers systèmes de classification en vigueur dans les pays de l'OCDE.

    iii) Une évaluation des avantages qu'offre la procédure à dose fixe par rapport à la méthode traditionnelle au niveau de la protection des animaux.

    iv) Une analyse pour déterminer le besoin d'utiliser les deux sexes dans la procédure à dose fixe.

    v) Une analyse pour confirmer la concordance des résultats entre les divers laboratoires.

ANNEXE 1
APPENDICE 1

ÉTUDE DE COLLABORATION INTERNATIONALE SUR LE PROTOCOLE DES TESTS DE TOXICITÉ AIGUË

TOXICITÉ ORALE AIGUË - DOSE FIXE

1. Renseignements préliminaires

Conditions requises
- Substance de test solide ou liquide
- Fiche signalétique de la substance de test

Documents types
- Il n'existe pas de normes internationales pertinentes.

2. Principe de la méthode de test

Cette procédure est conçue pour remplacer l'étude de toxicité orale aiguë traditionnelle ou étude de la DL50, comme elle est parfois appelée.

La substance de test est administrée par voie orale, par gavage, à un seul niveau de dose à un groupe de rats. La dose utilisée est choisie à partir d'une série de niveaux à dose fixe établis d'avance. La dose choisie est celle que l'on juge capable de produire une toxicité évidente[1], mais pas la mort. En l'absence de données permettant de prédire la toxicité possible de la substance de test, une étude jugée préliminaire, utilisant trois à six animaux, est effectuée.

Après avoir administré la substance aux rats, ceux-ci font l'objet d'une observation attentive visant à déceler les effets. Les animaux tués pour des raisons humanitaires, parce qu'il est évident qu'ils souffrent ou qu'ils manifestent des signes de grave détresse, ainsi que tous ceux qui meurent au cours de l'essai, sont nécropsiés. À la fin de l'essai, les animaux qui restent sont nécropsiés. Lorsqu'on n'a pas observé de toxicité évidente avec le niveau de dose choisie, la substance doit être retestée au niveau de dose supérieur suivant préétabli. Lorsque les animaux meurent, ou qu'une grave

---

[1] La toxicité évidente est un terme général désignant les signes évidents de toxicité induits par des composés, mais non de manière à provoquer une très grande souffrance, la détresse ou la mort. On peut s'attendre à ce qu'une augmentation importante de la dose administrée, c'est-à-dire au niveau de dose supérieur le plus proche préétabli, entraîne le développement de signes très sévères de toxicité, et probablement la mort.

réaction toxique exige le retrait des animaux de l'étude afin de les protéger, la substance doit être retestée au niveau de dose inférieur suivant préétabli. Le niveau de dose qui provoque la toxicité évidente mais pas la mort, est utilisé pour classer la substance de test dans la catégorie des substances toxiques.

3. Description du protocole de test

Préparations :

- Les jeunes rats adultes et sains doivent être choisis au hasard et habitués aux conditions de laboratoire au moins cinq jours avant l'essai.

- Le cas échéant, la substance de test est dissoute ou mise en suspension dans le véhicule indiqué sur la fiche signalétique. Le volume minimum de liquide qui doit être administré ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où on peut utiliser jusqu'à 2 ml/100 mg.

Les animaux d'expérimentation :

- On doit avoir recours à une souche de rats couramment utilisée en laboratoire. La variation de poids des animaux utilisés dans un test ne doit pas être supérieure à ± 20 pour 100 du poids moyen.

Le nombre et le sexe :

- Trois à six animaux (mâles et femelles) sont utilisés dans l'étude au jugé. Il conviendrait d'utiliser dix animaux (cinq femelles et cinq mâles) pour chaque niveau de dose étudié dans le test principal. Il convient d'utiliser des femelles nullipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation :

- La température de la pièce où se trouve l'animal d'expérimentation doit être de 22 °C (± 3°) et l'humidité relative de 30 à 70 pour 100. Les animaux peuvent être groupés dans les cages selon le sexe, mais le nombre d'animaux par cage ne doit pas empêcher l'observation libre de chaque animal. Dans le cas d'un éclairage artificiel, la séquence doit être de 12 heures d'éclairage, 12 heures d'obscurité. En ce qui concerne l'alimentation, les régimes de laboratoire traditionnels peuvent être utilisés avec un approvisionnement illimité en eau potable.

Le protocole d'essai :

- Étant donné que l'étude est menée à l'aveugle, les laboratoires n'auront aucune indication sur la toxicité d'une substance. Ils devront donc faire l'étude en deux étapes :

    - une étude au jugé;
    - le test principal.

1. L'étude au jugé

Cet exercice ne fait pas partie intégrante du protocole à «dose fixe» et les évaluateurs n'exigent pas de rapport à son sujet. L'étude au jugé a pour objet de déterminer l'unique niveau de dose à utiliser dans le test principal. Il est recommandé d'administrer à trois groupes composés chacun d'un rat mâle et d'un rat femelle des doses de 5, 50 et 500 mg de substance par kg de poids corporel, puis de les observer pour détecter les signes de toxicité. Le niveau de dose (5, 50 ou 500 mg/kg) qui induit une toxicité évidente (*voir* définition) mais pas la mort, doit être déterminé. (Remarque : la mortalité inclut les animaux tués pour des raisons humanitaires, mais pas la mort accidentelle). Lorsqu'on n'observe pas de toxicité évidente à un niveau de dose de 500 mg/kg de poids corporel, il convient d'utiliser une dose de 2 000 mg/kg de poids corporel, dans le test principal.

2. Le test principal

Dix rats (5 mâles et 5 femelles) sont utilisés. Avant d'administrer la substance aux animaux, il faut les faire jeûner en ne leur laissant rien à manger pendant la nuit.

Après la période de jeûne, les animaux doivent être pesés puis la substance de test administrée en une dose unique par gavage au moyen d'une sonde stomacale ou d'une canule d'intubation appropriée. La dose administrée doit être celle qui a été déterminée dans l'étude au jugé. Après l'administration de la dose, il ne faut rien donner à manger à l'animal pendant trois à quatre heures supplémentaires.

Une fois la substance de test administrée, des observations faites à côté de la cage sont consignées dans un fichier individuel, c'est-à-dire un par animal. Aux fins de cette étude de collaboration, il est souhaitable de procéder à des observations fréquentes pour détecter les signes cliniques de la toxicité. Au moins deux examens cliniques attentifs devraient donc être effectués le jour de l'administration de la dose ainsi que les jours où les signes de toxicité persistent. Tout animal manifestant une importante douleur ou des signes évidents de détresse doit être sacrifié, mais l'observation des animaux restants dans le groupe doit se poursuivre pendant 14 jours complets. Les animaux qui meurent pendant l'essai et ceux qui ont été tués pour des raisons humanitaires doivent être nécropsiés. À la fin de la période d'observation de 14 jours, les animaux restants sont nécropsiés.

Il peut devenir très rapidement évident au directeur d'étude qu'en dépit de l'étude au jugé, la dose administrée était trop forte (entraînant la mort ou le besoin de retirer les animaux de l'étude pour des raisons humanitaires) ou trop faible (ne donnant aucun signe évident de toxicité). Dans les deux cas, il sera nécessaire de répéter l'étude en utilisant dix autres rats au niveau de dose supérieur ou inférieur le plus proche, tel que requis. Il convient de se rapporter à la page __ de ce protocole, où tous les détails de la mesure à prendre sont donnés dans chaque cas.

Examens cliniques :

- Sauf dans le cas où un essai doit prendre fin prématurément pour des raisons humanitaires, la période d'observation doit se poursuivre pendant 14

jours. Le moment auquel les signes de toxicité apparaissent et disparaissent est important, notamment si les signes de toxicité semblent être différés. Les observations doivent porter sur les modifications manifestes dans la peau, le pelage, les yeux, les membranes, les systèmes nerveux central et autonome, circulatoire et respiratoire, ainsi que l'activité somatomotrice et les modes de comportement. Les poids corporels individuels doivent être déterminés peu avant l'administration de la substance. Les animaux doivent être pesés chaque jour pendant la première semaine et ensuite à la mort. À la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés avant d'être sacrifiés.

La pathologie :

- Tous les animaux testés doivent subir une nécropsie macroscopique. Tous les résultats pathologiques macroscopiques doivent être consignés.

Le rapport des tests :

- Pour harmoniser les rapports des résultats, on a conçu un formulaire type qui doit être rempli par le directeur d'étude. Les évaluateurs sauront gré aux laboratoires participants de se conformer au format recommandé, étant donné que la tâche de l'analyse des résultats en sera facilitée.

- Un formulaire doit être rempli pour chaque substance et pour chaque niveau de dose testé. Aucun autre rapport n'est requis, mais les commentaires que pourraient faire les laboratoires sur n'importe quel aspect de leur expérience avec le protocole à dose fixe seront bien accueillis.

L'interprétation des résultats :

- Les résultats de l'étude collaborative seront interprétés par le Comité d'organisation, dont l'évaluation sera présentée lors d'une réunion parrainée par la Commission des communautés européennes, réunion qui se tiendra du 19 au 21 septembre 1989 à Munich, en Allemagne de l'Ouest. C'est pourquoi les laboratoires ne sont pas tenus d'interpréter les résultats qu'ils ont obtenus.

RÉCHERCHE DE LA TOXICITÉ ORALE AIGUË - PROCÉDURE À DOSE FIXE

DOSE	RÉSULTAT	ACTION
5 mg/kg*	Moins de 100% de survie**	RAPPORT DES RÉSULTATS
	100% de survie ; mais toxicité évidente	RAPPORT DES RÉSULTATS
	100% de survie ; pas de toxicité évidente	Retester à 50 mg/kg. Lorsque déjà testé à cette dose indiquer les résultats des deux tests.
50 mg/kg	Moins de 100% de survie**	Retester à 5 mg/kg. Lorsque déjà testé à cette dose, rapporter les résultats des deux tests.
	100% de survie ; mais toxicité évidente	RAPPORT DES RÉSULTATS
	100% de survie ; pas de toxicité évidente	Retester à 500 mg/kg. Lorsque déjà testé à cette dose, rapporter les résultats des deux tests.
500 mg/kg	Moins de 100% de survie**	Retester à 50 mg/kg. Lorsque déjà testé à cette dose, rapporter les résultats des deux tests.
	100% de survie ; mais toxicité évidente	RAPPORT DES RÉSULTATS
	100% de survie ; pas de toxicité évidente	Retester à 2000 mg/kg. Lorsque déjà testé à cette dose, rapporter les résultats des deux tests.
2000 mg/kg	Moins de 100% de survie**	Retester à 500 mg/kg. Lorsque déjà testé à cette dose, rapporter les résultats des deux tests.
	100% de survie ; avec ou sans toxicité évidente	RAPPORTER LES RÉSULTATS

* Aux fins de l'Étude de collaboration internationale, il n'est pas nécessaire d'enquêter sur les effets des doses inférieures à 5 mg/kg de poids corporel.

** Comprend la mort due au composé et la mort provoqué par l'homme, mais pas la mort accidentelle.

ANNEXE 2
SOCIÉTÉ DE TOXICOLOGIE DU CANADA
EXPOSÉ CRITIQUE SUR LA DL50[1]

Historique

Au début du XX[e] siècle, de nombreux agents médicinaux utilisés étaient disponibles sous forme de mélanges impurs ou de produits extraits de la biologie («produits biologiques») plutôt que sous une forme chimique pure. Il était souvent difficile de préparer des produits uniformes par de tels procédés, étant donné que la quantité d'ingrédients «actifs» variait considérablement d'un produit à l'autre. Dans le cas de plusieurs de ces agents, il était possible d'établir une corrélation entre la capacité thérapeutique active du mélange et la puissance létale du mélange ou extrait. S'il était possible de calculer avec précision l'activité létale, on ne pouvait évaluer qu'indirectement l'activité thérapeutique de cette même substance. Les «doses» thérapeutiques efficaces pour les produits biologiques étaient souvent exprimés en «unité d'activité» plutôt qu'en unité de poids. Ainsi, les méthodes quantitatives étaient élaborées pour évaluer la puissance létale avec précision, permettant d'établir la normalisation d'agents médicinaux issus de la biologie.

Pour des raisons statistiques, la dose létale moyenne (DL50, le dosage estimé tuer 50 pour 100 de la population universelle de l'espèce testée) a été jugé être le moyen le plus précis pour quantifier la capacité létale. En outre, on a découvert que la précision mathématique de la DL50 calculée statistiquement était directement liée au nombre d'animaux soumis à chaque dose de test et au nombre de niveaux de dose (taux de mortalité variant entre 10 et 90 pour 100) utilisés pour obtenir les données sur la réaction à la dose létale. La DL50 a ainsi été introduite en pharmocologie et en toxicologie car il était réellement nécessaire d'évaluer la puissance de certaines catégories d'agents médicinaux.

La détermination de la DL50 a fait l'objet d'une application plus générale. La quantification de la létalité sest généralisée. La DL50 est devenue l'un des premiers outils expérimentaux quantifiables dont disposait le toxicologue. Avec un tel outil, il pouvait classer et comparer les substances chimiques en fonction de leurs capacités létales quantitatives. Les extrapolations des dangers potentiels à l'échelle humaine dus à une exposition aiguë à des quantités relativement grandes de substances chimiques ont été faites en fonction des données de la DL50 sur les

---

[1] Adoptée à l'assemblée générale de la STC le 3 décembre 1985 directement liée au nombre d'animaux soumis à chaque dose de test et au nombre de niveaux de doses (donnant des valeurs de 10 pour 100 à 90 pour 100 de mortalité) utilisés pour produire les données sur la létalité, la dose et la réaction. La DL50 a donc été introduite en pharmacologie et en toxicologie en raison de la nécessité de calculer la puissance de certaines classes de substances médicinales.

animaux. Ces déterminations ont été effectuées pour différentes espèces et selon différentes voies d'administration.

Situation actuelle

On ne peut discuter isolément de l'utilité de la DL50. L'évaluation des propriétés létales des substances chimiques fait partie intégrante du processus d'évaluation employé pour tester l'innocuité de diverses substances chimiques, comme les médicaments, les produits cosmétiques, les additifs alimentaires, les pesticides, les substances chimiques auxquelles on peut être exposé à la maison ou au travail, au cours d'activités récréatives ou du passe-temps favori, ainsi que les substances chimiques dispersées dans le milieu. Les toxicologues déterminent les effets indésirables que ces substances peuvent avoir lorsque diverses espèces vivantes y sont exposées dans diverses conditions. L'espèce qui nous préoccupe le plus est évidemment l'espèce humaine, mais il est important de se rendre compte qu'un grand nombre d'autres espèces mammifères et non mammifères peuvent être les cibles biologiques de telles agressions.

L'évaluation de l'activité létale des substances chimiques est généralement associée à la phase de toxicité aiguë du processus d'évaluation de l'innocuité des substances. Les doses et les conditions d'exposition qui entraînent la réaction létale doivent être établies au moyen d'évaluations toxicologiques bien effectuées. S'il est probable que l'être humain entre en contact avec une substance chimique particulière (volontairement ou involontairement, par accident ou à dessein), il est nécessaire d'en connaître la gamme de létalité pour pouvoir le protéger. Les modalités de traitement ou les antidotes précis à utiliser dans le cas d'intoxications chimiques dépendent des connaissances suffisantes sur le processus létal. Les questions se rapportant au niveau de précision requis pour exécuter le protocole de la DL50 sont fondées. En revanche, les questions traitant de la nécessité d'évaluer la létalité doivent être logiques et tenir compte de la responsabilité en matière de protection de la société.

Des données très nombreuses ont été compilées sur la DL50; leur utilité a été mise en doute par un certain nombre de toxicologues. Ceux-ci ont déploré la mauvaise utilisation de la DL50, c'est-à-dire son utilisation comme une sorte de «valeur biologique constante». En biologie, la variabilité est de règle. C'est aussi vrai lorsque la réaction biologique est la mort. Les valeurs de la DL50 varient selon les espèces et au sein d'une même espèce. En outre, il est connu que des facteurs tels que l'âge, l'état nutritionnel et les conditions du milieu affectent la capacité létale. Ainsi, la valeur de la DL50, indépendamment de sa précision, ne peut jamais être considérée comme une valeur constante.

Les toxicologues se rendent également compte qu'une valeur de la DL50 déterminée avec précision (à raison de limites fiducielles de 95 p. 100) ne reste qu'une estimation de la situation pouvant se produire au sein de la population des espèces testées. Compte tenu de la variation bien connue entre espèces, une grande précision est-elle vraiment nécessaire? Les toxicologues remettent en question le besoin de précision dans la détermination des valeurs de la DL50.

Les toxicologues peuvent tirer des renseignements importants sur la capacité létale et le processus conduisant à la létalité sans faire un calcul précis de la DL50 (avec de très petites limites fiducielles de 95 p. 100). Il est important d'observer attentivement les animaux auxquels on a administré des doses létales ou presque létales afin de connaître les altérations pathologiques et fonctionnelles manifestes chez ces animaux. Les questions concernant la létalité aiguë peuvent être résolues par l'utilisation de calculs mathématiques moins précis que ceux traditionnellement employés pour calculer les DL50. Les méthodes qui requièrent moins d'animaux peuvent certainement être utilisées pour calculer une valeur de la DL50 ou pour produire une estimation raisonnable des doses qui frôlent la gamme de létalité. Il est peu probable que des connaissances significatives puissent nous échapper en utilisant ces techniques dans le cadre du processus d'évaluation de l'innocuité des substances. Par ailleurs, un examen plus complet des animaux utilisés pour le calcul de la capacité létale serait de rigueur. On peut en faire plus pour obtenir des données biologiques utiles à partir des animaux utilisés dans les études de la létalité.

Certaines questions ont été soulevées concernant l'utilité de la détermination des DL50 chez un certain nombre de différentes espèces animales. Il ne faut pas oublier que l'un des objectifs du processus d'évaluation de l'innocuité des substances est de fournir des données sur les effets indésirables observés chez les animaux de laboratoire, données pouvant être transposées à l'être humain, aux animaux domestiques et sauvages, ou aux animaux en captivité exposés aux mêmes substances chimiques. Lorsqu'on trouve que la dose létale des substances chimiques est la même pour plusieurs espèces, la transposition des données sur la toxicité à l'échelle humaine est plus sûre. Lorsque les mêmes effets toxicologiques sont observés chez plusieurs espèces d'animaux, il est probable qu'un mécanisme d'activité commun soit en jeu chez ces espèces et qu'il se produira probablement chez les êtres humains. Dans ce cas, l'extrapolation devrait être plus fiable. Cependant, lorsque la dose létale varie considérablement dans un certain nombre d'espèces, l'extrapolation devient ténue. Ce genre d'observation indique que la toxicité est liée à l'espèce et qu'il est nécessaire d'effectuer d'autres études pour déterminer quelles espèces ressemblent à l'espèce humaine. Ainsi, la détermination de la puissance létale d'une substance chez plusieurs espèces peut influer nettement sur le degré de confiance que l'on peut accorder à l'extrapolation à l'échelle humaine. En outre, ces résultats peuvent largement influer sur les genres d'études biologiques ou toxicologiques supplémentaires pouvant être requises pour résoudre la question. Il n'apparaît donc pas sage de limiter *a priori* le nombre d'espèces devant être testées dans les études de la létalité.

Il est également possible d'obtenir des renseignements importants à partir d'études de la létalité menées en ayant recours à diverses voies d'administration. Dans le passé, de telles observations ont été très importantes dans les conclusions sur la biodisponibilité relative (quantité absorbée) de diverses substances chimiques à la suite d'une exposition par diverses voies d'administration. Elles ont été essentielles pour déterminer quelles substances chimiques pouvaient être manipulées sans danger. Ces données peuvent aussi aider à déterminer les conditions d'exposition qui présentent relativement peu de risque lorsque les matières chimiques doivent être utilisées dans le commerce. Il apparaît donc

déconseillé de limiter *a priori* les voies d'administration qui doivent être employées dans les études de la létalité.

Selon l'utilisation prévue des données engendrées, on emploiera ou non un test de létalité particulier ou on fera preuve de la précision nécessaire lorsque le test est choisi. Cela signifie qu'il faut examiner les problèmes toxicologiques qui peuvent se poser. Les estimations relatives à la capacité d'une substance à entraîner la létalité aiguë sont aujourd'hui des données très importantes pour le classement des substances chimiques devant être transportées en tant que substances dangereuses. Dans le cas de déversements accidentels ou de déraillements, par exemple, les conséquences pour l'être humain sont des effets indésirables associés à l'exposition aiguë temporaire à une forte concentration de la substance chimique. En milieu de travail, des décharges accidentelles peuvent se produire, entraînant des expositions immédiates à des quantités potentiellement nocives. Dans de tels cas, il est indispensable de disposer de données DL50 solides.

Il importe de souligner qu'il n'existe pas de méthodes substitutives connues et validées à l'expérimentation animale pour évaluer la capacité létale. Et il n'est pas non plus probable que de telles méthodes apparaissent dans l'immédiat. Certaines initiatives ont été prises pour élaborer des techniques pouvant prédire la capacité létale de certaines classes de substances chimiques en fonction des relations déjà connues entre la structure et l'activité. Les démarches concernant les relations quantitatives entre la structure et l'activité (RQSA) et les relations quantitatives entre la structure et la toxicité (RQST) l'illustrent bien. La fiabilité de la RQSA dépend de la disponibilité de données sur (1) des interactions entre les substances chimiques bien définies (2) appartenant à des séries congénères de structures et (3) un site d'activité déjà connu d'un système biologique. On a dit que la démarche RQSA suppose la présence d'un site d'activité doublé d'effets biologiques observés non ambigus (en ce qui concerne le mécanisme d'action). Nos connaissances toxicologiques actuelles sont insuffisantes pour fournir les données nécessaires pouvant permettre de tirer parti de la démarche de la RQSA. C'est pourquoi, bien que ces initiatives doivent être encouragées, il est évident qu'elles ne ne sont pas suffisamment fiables pour remplacer l'expérimentation animale clinique.

Une question politique importante joue également un rôle en ce qui concerne le processus d'évaluation de l'innocuité. Les évaluations toxicologiques sont utilisées pour protéger le public contre les effets indésirables possibles des substances chimiques. Le public juge que les particuliers ont le droit de vivre dans un milieu «sûr». Le climat litigieux défavorable qui règne en Amérique du Nord reflète cette perception du public. Ce climat influe indirectement sur la pratique de la toxicologie. Comment les toxicologues ou les responsables des règlements gouvernementaux justifieront-ils leur décision de n'avoir pas réalisé une étude toxicologique particulière, jugée n'avoir qu'une valeur limitée, lorsqu'à une date ultérieure, des litiges pourtant se produiront en raison de cette décision?

Conclusions

La position de la Société de toxicologie du Canada envers la DL50 peut se résumer de la manière suivante :

1. L'évaluation des propriétés létales des substances chimiques fait partie intégrante des évaluations toxicologiques conçues pour protéger le public et son environnement.

2. Des questions toxicologiques bien fondées doivent déterminer la mesure dans laquelle l'évaluation de la létalité doit être réalisée. Le nombre d'espèces testées, la gamme des doses employées et le nombre de voies d'administrations étudiées devraient être minimales, mais conformes aux pratiques toxicologiques établies.

3. Le plus souvent, il ne semble pas indispensable de calculer la DL50 avec une grande précision mathématique. Par conséquent, les procédures qui permettent d'estimer ce paramètre avec un petit nombre d'animaux devraient être privilégiées.

4. Tous les efforts doivent être déployés pour que les résultats de ces études soient largement diffusés et communiqués au niveau international, et ce, afin d'éviter la répétition inutile de ces études.

5. Les toxicologues doivent participer à la mise sur pied de banques de données biologiques qui peuvent mener à l'élaboration de méthodes de calcul de la capacité létale des substances, méthodes n'ayant pas recours aux animaux.

ANNEXE 3
SIGNES CONTRADICTOIRES AU CANADA[1]

Selon la ressource (12 [1], 4, 1987) du Conseil canadien sur la protection des animaux, le ministre canadien de la Santé et du Bien-être social a déclaré que, même si peu de tests de la DL50 sont réalisés au Canada, le calcul d'une DL50 est une étape importante de l'évaluation de la toxicité aiguë de toute nouvelle substance à laquelle l'être humain peut se trouver exposé. Selon un autre avis, celui de Kenneth Bailey de Santé et Bien-être social Canada, la «DL50 n'a plus la cote» et, selon la Société de toxicologie du Canada (STC), «le plus souvent, il ne semble pas essentiel de calculer la DL50 avec une grande précision mathématique. Par conséquent, les procédures qui permettent d'estimer ce paramètre avec un petit nombre d'animaux devraient être privilégiées».

Le point de vue du Ministre, l'honorable Jake Epp, semble avoir prévalu, à la consternation des sociétés pharmaceutiques d'autres pays qui désirent vendre leurs produits au Canada. Les organismes de réglementation du Canada sont déjà considérés comme réactionnaires, mais de nouvelles lignes directrices toxicologiques précliniques provisoires, produites en septembre 1987 par le Bureau des médicaments humains prescrits, qui relève de la Direction générale de la protection de la santé de Santé et Bien-être social Canada semblent devoir faire empirer une situation déjà mauvaise.

Ces lignes directrices provisoires requièrent la réalisation d'études sur la toxicité aiguë chez les deux sexes de trois espèces au moins (deux de rongeurs, une de non-rongeurs autre que le lapin), avec au moins dix animaux par sexe, par dose, et au moins trois doses autres que la DL50 et la DL100, dans tous les tests de rongeurs; une détermination de la DL50, ou le cas échéant, de la DLM, sera suffisante pour les espèces de non-rongeurs, bien qu'il faille néanmoins utiliser des animaux des deux sexes. En cas de différences importantes, soit quantitatives, soit qualitatives, des espèces supplémentaires devront être utilisées.

Les représentants de SBSC et de la STC devront informer les toxicologues non canadiens des raisons de ces recommandations, qui vont à l'encontre de la tendance générale vers une plus grande rationalisation.

Source : *ATLA 15*, 180, 1988

---

[1] La directive du 15 novembre 1989, tirée du ADM-HPB et reprise intégralement à la page __ du présent rapport, semblerait avoir remédié à ce problème, de sorte que ces critiques et d'autres critiques défavorables à l'égard des exigences canadiennes en matière d'essai de toxicité aiguë ne sont plus pertinente.

ANNEXE 4

AUTRES POSSIBILITÉS DANS LES MÉTHODES IN VITRO

3.1 : Cultures cellulaires (tests de toxicité)

Objet du test	Procédure de tests et évaluation	Substances de tests	(essai de Draize sur les yeux de lapin)
Cellules d'hépatomes humaines (Hep G2) fibroblastes murins (BAL8/c 373) Fibroblastes de chinois (V79) Cultures de macrophages murins Cellules cornéennes épithéliales de lapin	1) Pré-incubation 24 h 2) Traitement avec composé de test et incubation pendant 24 h 3) Les cellules du ont pu se répliquer pendant 7 jours pour former des colonies 4) Cultures fixes, colorées et colonies comptées. 5) Résultats exprimés en pourcentages de formation de colonies des contrôles non traités.	Alcools, éthers, esters, cétones, acides, amides, détergents, chlorure de chlorure de benzéthonium Tween (34 substances)	Les doses les plus élevées tolérées déterminées pour chaque composé de test ont été classées entre elles et par rapport aux données publiées sur les effets irritants pour les yeux de concordance satisfaisante entre les 5 méthodes et conforme au classement des effets irritants pour les yeux Borenfeund et Borrero (1984)
Cellules fibrobastes de souris BALB/c 373	1) Pré-incubation 24 h 2) Traitement avec composé de test incubation pendant 24 h 3a) Résultats morphologiques pour effets cytotoxiques 3b) Détermination de la captation du rouge neutre par spectrophotométrie	Chlorure de benzalkonium, chlorure de benzéthonium, Triton X-155, laurylsulfate de sodium, Tween 60, TEA-laurylsulfate (6 substances)	Le classement observé de chaque évaluation (effets cytotoxiques et captation de rouge neutre) concordent avec les observations <u>in vivo</u> (essai de Draize) Borenfreund et Peurner (1985)
Cellules cornéennes d'yeux de lapins normaux (cellules cornéennes de lapins SIRC) 169	Réduction de l'efficacité du clonage 1) pré-incubation de 400 cellutes 18 h 2) traitment pendant une heure avec des substances d'essai dans différentes concentrations 3) formation de colonies au cours d'une incubation de 7 jours afin de pouvoir déterminer le taux de survie moyen par rapport aux contrôles négatifs et à la CL50	13 surfactifs (5 cationiques, 3 anioniques, 2 amphoteniques, 3 non ioniques)	L'analyse de la corrélation des rangs a donné un coefficient de corrélation de 0,90 North-Root et al. (1982) North-Root et al. (1983)
		6 shampooings	Concordance à 100 % North-Root et al. (1985)

Annexe 4

3.1 : Cultures cellulaires (test du décollement de cellules, d'inhibition de la croissance et de la capacité de clonage)

Objet du test	Procédure de tests et évaluation	Substances de tests	Essai de Draize sur les yeux de lapin
1. Fibroblastes de rein de hamster nouveau né (BHK-21/C13) 2. Passage précoce (Keller) et tardif (MRC-5) de fibroblasts humains	Trois paramètres mesures 1. analyse du décollement cellulaire pré-incubation de 24 h. 4 h d'exposition à la substance de test 2. Inhibition de la croissance pré-incubation 24 h. 48 h d'exposition à la substance de test. Cellules comptées avant et après l'incubation. 3. Capacité de clonage 7 jours d'exposition à la substance de test cellules fixées et colorées avec Giemsa. Analyse du décollement cellulaire et capacité de clonage. Nombre de colonies exprimé en tant que pourcentage de contrôle (LC50).	57 substances chimiques de diverses classes (sels métalliques à l'état naturel ou non, solvants, détergents, réactifs, drogues).	L'ordre de classement résultant des données in vitro était mieux corrélé avec les valeurs-seuil relatives à l'air en milieu de travail humain (VLT/MPT) qu'aux valeurs DL50 (rat, voie orale). La corrélation avec les données des essais de Draize sur les effets irritants pour la peau et les yeux n'étaient pas déterminées puisque les valeurs in vivo disponibles étaient dérivées à partir de divers systèmes de calcul différents. Mais les données in vitro avaient une valeur de prédiction de 80 pour 100 de la classification in vivo (effets irritants pour les yeux et la peau) lorsqu'utilisées pour répartir les substances chimiques en trois classes générales (non irritant ou corrosif, légèrement à modérément irritant ou corrosif, fortement irritant ou corrosif). Reinhardt et al. (1985)
		3 substances chimiques endogènes (glutathione, 1-méthionine, 1-cystéine HCL) et 4 composés organotines.	La corrélation n'a pas été calculée, pas de données in vivo disponibles, mais dans les deux essais, tous les composés testés ont été classés selon la même séquence de toxicitéque celle connue à partir des études in vivo Reinhardt et al. (1982)

Annexe 4

3.1 : Cultures cellulaires (captation du rouge neutre. Test de libération 51 Cr)

Objet du test	Procédure de tests et évaluation	Substances de tests	Essai de Draize sur les yeux de lapin
Cellules BALB/c-373 (fibroblastes de souris)	Captation du rouge neutre en tant que mesure des effets toxiques des substances 1) pré-incubation de 24 h 2) échantillons de test ajoutés aux cultures semi-confluentes de 24 h incubation 3) échantillons de test retirés au bout de 3 h d'incubation 4) détermination de la captation RN autres La concentration RN dans le milieu d'extraction est détérminee par voie spectrophotométrique; le résultat est exprimé en pourcentage des valeurs des contrôles.	Chlorure de benz-alkonium, chlorure de benzéthonium, Triton X-15, larylsulfate de sodium, Tween 60, TEA-laurylsulfate (6 substances). Différentes substances chimiques, alcools, surfactants et substances. 9 composés de test (différentes sub-stances chimiques avec classification des effets pour les yeux allant de non irritant a légèrement, modérément à gravement irritant).	La captation du rouge neure concorde avec les observations in vivo (essai de Draize) Borenfreund et Puerner (1985) Lorsque utilisé comme test de dépistage, corrélation raisonnable dépendant de la classe de la substance chimique testée. Künstler et al. (1986-b). La captation RN et effets irritants pour les yeux (essai de Draize) indiquaient une <<bonne concordance>>. Hockley et Baxter (1986)
Cultures de cellules épithéliales cornéennes primaires de lapins cellules-SIRC. Cellules YAC-cellules P 815, lignee P 815, cellules YAC-1, SIRC.	1) Cellules radioétiquetées avec 51 Cr pendant 2 heures 2) Exposition de cellules radio-marquées à des dilutions sériées deux fois de substance à tester pendant 4 h 3) centrifugation des plaques (microtitre) 4) Détermination du 51 Cr des surnageants avec un compteur gamma DC 50 représente la concentration de la substance de test ayant causé la libération de 50 % de cellules radiomarquées.	5 surfactants (chlorure de benzalkonium, 2-sulfates alkyléthoxylate, sulfate dodécylsodique, savon noix de coco, polysorbate 20)	<<Bonne corrélation>> entre les données in vivo et in vitro Sadduck et al. (1985-a)

Annexe 4

3.1 : Cultures cellulaires (test de cytoxicité, essai de la membrane cellulaire)

Objet du test	Procédure de tests et évaluation	Substances de tests	Essai de Draize sur les yeux de lapin
Lignées de cellules épithéloïdes humaines (Hela et HEp2)	L'intégrité de la membrane cellulaire évaluée à l'aide de bromure d'éthidium et diacétate de fluoréine. La perte de cette fluorochromasie corrélée avec d'autres indicateurs de lesion cellulaire.	12 surfactants	Correlation variable avec les donnees in vivo concernant les surfactants cationiques et anioniques. Scalfe (1982)
	Evaluation de l'integrite de la membrane cellule-membrane en mesurant la liberation de phosphatase alcalin. Les donneos evaluees par determination des valeurs CE50.	4 surfactants	<<Bonne correlation>> entre donnees in vitro et les donnees sur les effets irritants pour les yeux de lapin. Scalfe (1985)
Cellules LS de souris dérivées de fibroblastes de souris NCTC L 925	50 % de mort cellulaire (DC50) apres exposition aux echantillons de test pendant 4 h.	11 produits commerciaux a base de detergents Kemp et al. (1983)	A une exception pres, correlation raisonnable entre donnees in vivo et donnees in vitro.

Annexe 4

3.1 : Cultures cellulaires (essai de la croissance cellulaire protéique, essai de captation de l'uridine)

Objet du test	Procédure de tests et évaluation	Substances de tests	Essai de Draize sur les yeux de lapin
Cellules de fibroblastes de souris BALB/c 373 et autres cellules.	Inhibition de la production protéique après incubation avec les substances de test mesurée incubation de 24 h dans le milieu de croissance avec le milieu contenant les matières de test en concentrations diverses 17 surfactants	25 substances chimiques (alcools, ethers, ésthers, cétones, amides, acides, détergents)	Classement bien corrélé avec les données publiees de l'essai de Draize. Shopsis et Sathe (1984)
		19 substances chimiques (alcools, etc.), Shopsis et al. (1985)	Modifications morphologiques cytotoxiques très bien corrélées avec les effets irritants sur les yeux.
	1) Toxicité cellulaire évaluée par microscopie a contraste de phase	9 alcools	Bonne corrélation avec les résultats sur les effets irritants pour les yeux relatifs de l'essai de Draize sur les yeux de lapin. Borenfreund et al. (1983)
	2) Protéine cellulaire déterminée par méthode rapide semi-automatique avec le réactif colorant Bio-Rad (chimmiques, agents)		
	3) Résultats; ug protéique/bien exprimée en pourcentage de la protéine cellulaire dans les cellules non traitées.	39 substances (antimicrobiens, cosmétiques)	Mauvaise corrélation, cultures cellulaires trop sensibles. Triemer et al. (1986)
Cellules BALB/c 373 et autres cellules.	Inhibition de la captation de l'uridine mesurée 1) cellules exposées à diverses concentrations d'échantillons de test pendant 4 h 2) Captation d'uridine H3 déterminée sur une période subséquente de 15 min.	25 substances chimiques (alcools, éthers, ésters, cetones, amides, acides, détergents) 19 substances chimiques (alcools, etc.) 17 surfactants	Classement bien corrélé avec les données publiées de l'essai de Draize. Shopsis et Sathe (1984) Inhibition de la captation de l'uridine bien corrélée avec les données de Draize, lorsque les deux groupes sont évalués séparément. Shopsis et al. (1985)
	Toxicité évaluée comme concentrations de matière de test (ug/ml) requises pour inhibition à 20 %, 40 % et 80 % (chimiques, alcools, surfactants)	9 alcools	Bonne concordance avec les résultats in vivo. Borenfreund et al. (1983)
		14 différentes substances	Utilisation comme test de dépistage. Corrélation plus ou moins bonne dépendant de la classe chimique des substances testées. Kunstler et al. (1986-a)

Annexe 4

3.2 : Organes et cultures d'organes (yeux de lapins énucléés, cornée de lapin isolée)

Objet du test	Procédure de tests et évaluation	Substances de tests	Essai de Draize sur les yeux de lapin
Yeux de lapin énucléés maintenus en chambres de perfusion saline.	1) Épaisseur cornéenne déterminée au moyen d'un biomicroscope à lampe à fente ajustée avec accessoire pour mesurer l'épaisseur	11 substances (hydroxyde de sodium, anhydride acétique, alcool allyle formaldéhyde, n-butanol, éthanol, acétone, QAV, toluène, propylène, glycol, glycérine)	Résultats des essais in vitro largement corrélés avec données in vivo et données enregistrées dans la littérature. Burton et al. (1981)
	2) échantillons solides (50 mg) placés sur la surface cornéenne. Les liquides sont appliqués sur le bord supérieur de la cornée		
	3) durée de contact variant de 10 s à 5 min		
	4) gonflement cornéen, modifications cornéennes marquées et intégrité histologique de l'épithélium évaluée jusqu'à près de 4 h après le traitement. Produits chimiques industriels, 18 produits agrochimiques formulés, trois produits agrochimiques non formulés, 14 huiles lubrifiantes formulées)	11 substances et un shampooing (100 % et 10 %) 10, 3r s., 2 et 5 min. de durée de contact)	Corrélation raisonnable entre résultats in vivo et in vitro. York et al. (1982)
		60 substances chimiques (25 irritants potentiels) Price et Andrews (1985)	La rapidité et le degré de gonflement cornéen étaient liées aux effets in vivo.
		39 substances (solvants comme acétone, éthanol, alcools, autres)	Corrélation entre résultats in vivo et in vitro pour 32 % de toutes les substances. Koeter et Prinsen (1985)
Cornée isolée de lapin	Modifications dans l'impédance électrique dans la cornée isolée mesurées en présence et en l'absence de divers détergents anioniques.	Six surfactants anioniques	La vitesse de changement de l'impédance décroît avec une augmentation de la longueur de la chaîne alkyle pour sulfate alkyle de sodium. Les résultats sont corrélés avec les résultats de l'essai sur les effets irritants pour les yeux in vivo. Scaife (1985)

Annexe 4

3.2 : Organes et cultures d'organes (opacité cornéenne, iléon isolé de lapin)

Objet du test	Procédure de tests et évaluation	Substances de tests	Essai de Draize sur les yeux de lapin
Cornée de b uf	1) Cornée trempée dans une solution Tyrode avec ou sans substance de test à 32°C 2) Mesure de l'épaisseur cornéenne ou opacité avec une lampe à fente spéciale ou opacimètre 3 Les courbes des effets des concentrations sont tracées industriels	Tetracaïne, benoxinate, chlorure de benzalkonium, sulfate décylsodique, laurylsulfate de sodium. 8 surfactants et 5 produits chimiques publiées Plusiers concentrations de laurylsulfate de sodium	Aucune donnée in vivo disponible. Andermann et Erhart (1983) Aucune comparaison. Muir (1984-1) Opacité cornéenne in vitro bien corrélée avec des données in vivo. Muir (1985) Opacité croît avec des concentrations accrues de NaLS. Haruyoshi Igarashi (1986)
Iléon de lapin	isolé Influence des substances de test de concentrations spontanées d'iléon isolé 1) Iléon placé dans des conditions types dans un bain d'organce 2) Contractions spontanées enregistrées à l'aide d'un oscillogramme 3) Toxicité (EC50) évaluée en tant que concentration qui bloque 50 % de l'activité spontanée.	8 surfactants 4 shampooings antipelliculaires, 4 shampooings pour adultes, 4 shampooings pour bébé 12 substances (alcools, aldéhydes, etc.) Six surfactants (trois sulfates, trois bromures) cinq shampooings sept pour adultes, 11 pour bébés	Bonne correlation entre EC50 et donnees in vivo. Muir et al. (1983) Corrélation avec des donnees in vivo. Muir et al. (1983) Valeurs EC-50 en corrélation avec les données sur les effets irritants in vivo. Muir (1983-b) Bonne corrélation avec données in vivo. Muir (1984-b) EC50 pour les shampooings antipelliculaires pour adultes et antipelliculaires, bébés <<bien corrélés>> avec les données des effets irritants pour les yeux avec 20 % de dilution, mais mauvaise corrélation avec les shampooings pour bébé. Muir et al. (1986)

Annexe 4

3.3 : Membrane chorio-allantoïde d' uf de poule (CAM) (essai CAM-HET ou test de la membrane chorio-allantoïde)

Objet du test	Procédure de tests et évaluation	Substances de tests	Essai de Draize sur les yeux de lapin
Oeufs de poule.	1) Dilutions de fertilisés substances de test appliquées à CAM d'oeufs de poules couvés pendant 14 jours 2) surfaces nécrotiques mesurées au bout de 48 à 72 heures, et lésions décrites 3) Données évaluées sur la taille et nature des lésions, avec seuuils de réactions <<positives>>	12 préparations de produits ménagers. Leighton et al. (1985)	Classement de c fficient de corrélation r = 0,72
		neuf substances chimiques connues pour leurs effets irritants pour les yeux possibles in vivo choisies à partir de données publiées effets irritants. Lawrence et al. (1986)	Pour 4 substances chimiques sur les 9, la réaction dans la CAM a été considérée prédictrice de l'activité in vivo. Le test CAM ne convient pas pour prédire les potentialités d'effets irritants in vivo de la conjonctivite par les substances. D'autres ne le considèrent pas une méthode de prédiction pertinente des effets irritants Lawrence et al. (1986)
	1) 0,2 ml de substances de test appliqué à la CAM le 10e jour d'incubation 2) 72 heures plus tard, nature des lésions évaluées (surface, vaisseaux sanguins, couleur)	39 substances (chimiques surfactants, agents antimicrobiens, cosmétiques) ayant des possibilités connues d'effets irritants de inoffensifs à sévères	Le test CAM est plus sensible que celui sur les yeux de lapin. Bonne corrélation dans le cas des effets irritants légers et grands. La corrélation est moins bonne pour les effets irritants modérés. Triemer et al. (1986)
	1) 0, 1 de matière de test est appliqué à la membrane le 12e jour. 2) Le degré d'injection et d'hemorragie des vaisseaux sanguins est calculé à 0, 5, 2, 5 et 10 min.	30 substances (chimiques, surfactants, agents antimicrobiens, cosmétiques) ayant des possibilitiés connues d'effets irritants de inoffensifs à sévères	Le test CAM est plus sensible que celui sur les yeux de lapin. Bonne corrélation dans le cas des effets irritants légers et grands. La corrélation est moins bonne pour les effets irritants modérés Triemer et al. (1986)

Annexe 4

3.3 : Membrane chorio-allantoïde d'oeuf de poule (CAM) (essai CAH-MET ou test de la membrane choro-allantoïde)

Objet du test	Procédure de tests et évaluation	Substances de tests	Essai de Draize sur les yeux de lapin
Oeufs de poule	1) 0, 2 ml ou 0, 1 g de fertilisés «substance de test appliqué sur la CAM le 10e jour. Les solides rincés au bout de 20 s. 2) évaluation des effets irritants sur les vaisseaux sanguins 0, 5, 2 et 5 min. après le traitement (hyperémie, hémorragie, coagulation)	3 véhicules, 7 agents antimicrobiens, 11 colorants composés d'oxydation et 8 shampooings commerciaux 190 substances et formulations environ	«Bonne corrélation» entre l'irritation CAM et les résultats et l'essai de Draize pour toutes les classes de testées Lüpke (1985-a, b) «Bonne corrélation» Lüpke (1986) «Grande reproductibilité» dans les résultats des tests TOPF-CAM de différents chercheurs et labratoires Lüpke et Kemper (1986)
	1) 300 ul de matière de test appliqués à la CAM le 10e jour 2) Réactions évaluées continuellement pendant 5 min. après application	13 substances chimiques (alcools, surfactants et autres)	Les résultats du test OPF-CAM ont une «bonne concordance» avec les résultats des études in vivo Künster et al. (1986-b)
Oeufs de poule	1) le 4e jour, 1 5 - 2 fertilisés ml d'albuminesont extraits pour créer un espace aérein élargi pour développement de CAM 2) le 14e jour, un anneau de teflon est placé sur la CAM et la matière de test est placée dans l'espace i intérieur de l'anneau 3) le 17e jour d'incubation, la taille de la lésion de la CAM est évaluée.	42 substances de test de diverse nature (soluble dans l'eau, matières particulaires et lipophiles)	31 échantillons sur les 42 avaient des effets irritants pour les yeux autant dans les tests in vitro qu'in vivo. Huit étaient des faux positifs dans l'essai sur la CAM, 3 négatifs dans les deux (essai sur les yeux de lapin et essai CAM) Kong (1987)

Annexe 4

3.4 : Autres méthodes (test de tétrahymène et test d'hémolyse d'érythrocytes)

Objet du test	Procédure de tests et évaluation	Subetances de tests	Essai de Draize sur les yeux de lapin
Tetrahyma thermophila	Inhibition de la mobilité d'un protozoaire 1) échantillons de test dilués dans un milieu MM2 filtré et ajoutés en volume égal à la suspension de Tetrahyma 3) le seuil est la dose tolérable la plus élevée permettant au moins 90 pour 100 des cellules de conserver une mobilité normale	8 alcools, 6éthers, 2 cétones, 3 acides, 4 bases, 5 sels, formaldéhyde, diméthylsulfoxyde	dans 58 % des tests, les résultats étaient semblables à ceux des rapports des tests in vivo de la littérature. Une réaction plus sévère avec T.thermophila dans 27 % des tests et une réaction moins sévère dans 15 % des tests. Silverman (1983)
Érythrocytes de b uf et de lapin	Courbes de la réaction à la dose construites pour chaque surfactant permettant le calcul de la concentration requise pour produire 50 % d'hémolyse (hémolyse EC50). 16 surfactants anioniques	8 surfactants anioniques, 4 surfactants cationiques	Puissance hémolytique in vitro incapable dêtre corrélée avec les résultats des tests in vivo sur les effets irritants pour les yeux de lapin Muir et al. (1983)
		16 surfactants anioniques	Pas de corrélation Kästner et Frosch (1981)

ANNEXE 5
Déclaration de l'AUCC sur l'utilisation des animaux en recherche et dans les tests

Association des universités et collèges du Canada

Le 14 mars 1989

J.P.W. Gilman
J.P.W. Gilman & Associates Consultants, Inc.
125, rue Waverley, bureau 1
Ottawa (Ontario)
K2P 0V3

Monsieur,

En réponse à votre lettre du 20 février adressée à Rosemary Cavan, directrice des communications de l'AUCC, j'ai le plaisir de vous confirmer la position suivante de l'AUCC :

> «L'AUCC, qui représente 88 universités et collèges d'études supérieures, reconnaît la nécessité d'utiliser des animaux de laboratoire dans la recherche et les tests. L'AUCC appuie également les efforts continus du milieu scientifique pour réduire cette utilisation par l'élaboration de méthodes *in vitro* appropriées et autres procédures pouvant fournir des normes égales ou supérieures au niveau des réalisations et de l'utilité des méthodes scientifiques ainsi que des avantages économiques aux entreprises de recherche et d'évaluation de l'innocuité de substances. À ces fins, l'AUCC appuie activement le Conseil canadien de protection des animaux depuis sa création en 1969 et endosse le mandat du CCPA, qui vise à encourager et à utiliser des procédures permettant de réduire le recours à des animaux lorsque cela s'avère approprié sur le plan scientifique.»

N'hésitez pas à utiliser cette déclaration dans le rapport que vous soumettrez à la Direction des médicaments, Direction générale de la protection de la santé, Santé et Bien-être social Canada.

Je vous prie d'agréer, Monsieur, l'expression de mes sentiments les meilleurs.

Claude Lajeunesse
Directeur

ANNEXE 6

Position recommandée de l'Université de Saskatchewan en ce qui concerne la DL50 et les essais de Draizes sur les effets irritants pour les yeux

Généralités

Le University Committee on Animal Care and Supply (UCACS) reconnaît que les tests de toxicité utilisant des animaux fait partie intégrante de certains programmes de recherche, ainsi que de l'évaluation de l'innocuité de nouveaux médicaments, composés et substances chimiques. Toutefois, selon ce comité, chaque fois que cela est possible, des systèmes de tests de remplacement devraient être utilisés pour obtenir les renseignements requis. Par conséquent, l'UCACS incite vivement les chercheurs à s'engager dans la recherche visant à valider des méthodes substitutives, qui peuvent convaincre les organismes chargés de la réglementation que la DL50 ou les essais de Draize sur les effets irritants pour les yeux ne sont plus nécessaires.

Lorsque les essais de Draize sur les effets irritants pour les yeux ou la DL50 utilisant des animaux feront partie de programmes de recherche de l'Université de la Saskatchewan, ils seront acceptés pour être étudiés par le Comité de protection des animaux tout comme d'autres méthodes qui ont recours à des animaux aux fins de recherche et d'enseignement sont acceptées et étudiées. Toutefois, il convient de faire un repérage préliminaire de la toxicité aiguë à l'aide de prédicteurs moléculaires et de tests réalisés avec ou sans animaux avant d'utiliser des animaux vivants à ces fins.

Le UCACS n'est pas prêt à accepter des présentations proposant d'effectuer des tests de DL50 seulement, ou des essais de Draize sur les effets irritants pour les yeux, sur une base contractuelle avec des organismes extérieurs, si ces essais ne font pas partie intégrante du programme général des tests de toxicité devant être effectués à l'Université de la Saskatchewan. Les tests de la DL50 et les essais de Draize sur les effets irritants pour les yeux ne seront acceptables que si un organisme de réglementation indique que ces essais sont obligatoires (*voir* procédures).

Procédures pour l'autorisation de protocoles

Les protocoles utilisant des DL50 et les essais de Draize sur les effets irritants pour les yeux, s'intégrant dans le projet de recherche *intra-muros* de l'Université de la Saskatchewan, seront étudiés conformément aux procédures de révision habituelles.

Avant qu'un protocole qui comprend les essais de la DL50 et essais de Draize sur les effets irritants pour les yeux en tant que volet d'une évaluation de l'innocuité de substances aux fins d'évaluation ne soit accepté par l'UCASC, une note écrite de l'organisme de réglementation (c'est-à-dire Direction de la protection de la santé ou Agriculture Canada, etc.) doit indiquer que les essais concernés font

nécessairement partie de la présentation aux fins d'autorisation ou de permis. L'organisme de réglementation ainsi que l'évaluateur doivent démontrer au comité qu'une méthode substitutive *in vitro* n'est pas acceptable, et les raisons doivent être énoncées par écrit.

Normes d'essais acceptables

Chaque fois que des tests de toxicité sont effectués, ils doivent se faire conformément aux lignes directrices établies, telles que les lignes directrices de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), ou conformément aux règlements de Santé et Bien-être social Canada ou de la U.S. Federal Drug Administration, préconisant l'utilisation du plus petit nombre d'animaux possible, et avec toute la considération visant à alléger la souffrance et la douleur infligées aux animaux.

Lorsqu'un test de la DL50 doit être faite, le plus de renseignements possible doivent être obtenus (c'est-à-dire autopsies complètes, etc.) afin de maximiser les avantages par animal utilisé dans les tests de toxicité aiguë.

La réduction de la douleur et de la souffrance

Les seuils précédant celui de la létalité de l'animal doivent être utilisés chaque fois que c'est possible. Les animaux menés in extremis devraient être tués le plus humainement possible.

En règle générale, les évaluateurs doivent adopter des procédures d'essais utilisant le moins d'animaux possible, ou bien les procédures qui sont les meilleures pour l'animal du point de vue moral; ils sont vivement incités à élaborer et à valider des méthodes substitutives.